

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Direktor: Prof. Dr. med. V. Höllt

**Akute und chronische Effekte opioider Agonisten
und Antagonisten auf Lernen und Gedächtnis**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von: **Andreas Drust**

aus: **Osterburg**

Magdeburg: **2011**

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Drust, Andreas:

Akute und chronische Effekte opioider Agonisten und Antagonisten auf Lernen und Gedächtnis. - 2011. - 85 Bl.: 30 Abb., 3 Tab., 90 Literaturquellen

Kurzreferat:

Opioide Effekte auf Lernen und Gedächtnis sind seit langem Gegenstand intensiver Forschung. Trotz der vielen Untersuchungen sind einige Ergebnisse widersprüchlich, andere ließen wichtige Fragen offen. Daher wurden akute und chronische Einflüsse der beiden Opioidagonisten Morphin und Etonitazen sowie des Opioidantagonisten Naloxon systematisch in den Lernmodellen Shuttle-Box und Y-Kammer untersucht. Weiterhin wurden Veränderungen dopaminerger Systeme nach einer Abstinenzperiode überprüft. Es zeigte sich, dass Morphin und Etonitazen nach akuter Gabe entgegengesetzte Effekte auf die Retention an den Lernmodellen hatten. Nach chronischer Vorbehandlung hatten beide Substanzen selbst keine Wirkung auf das Lernen. Allerdings störten sie die Gedächtnisretention nach erneuter Applikation. Morphin unterschied sich dabei in seinem Einfluss von den akuten Tieren. Etonitazen hingegen zeigte vergleichbare Ergebnisse zwischen akut und chronisch vorbehandelten Tieren. Weiterhin ließ sich nach chronischer Morphinvorbehandlung nach 10 Wochen ein deutlicher Trend einer veränderten dopaminergen Neurotransmission zeigen. Bei Etonitazen blieb dieser Effekt aus. Dies ist möglicherweise auf das unterschiedliche Toleranz- und Sensibilisierungspotenzial beider Substanzen zurückzuführen. Naloxon wurde lediglich in einer akuten Behandlung an den Lernmodellen untersucht. Hierbei zeigte sich kein messbarer Einfluss auf das Lernen und die Gedächtnisretention. Ein in der Literatur häufig postulierter retentionsverbessernder Effekt ließ sich somit unter den getesteten Bedingungen nicht reproduzieren.

Schlüsselwörter:

Lernen – Gedächtnis – Opioide – Morphin – Etonitazen – Naloxon – Apomorphin – Ratte – Shuttle-Box – Y-Kammer – akute Behandlung – chronische Behandlung – Aktivität

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1. Geschichte der Opioide und ihre physiologischen Wirkungen	1
1.2. Opioideinfluss auf Lernen und Gedächtnis	3
1.3. Gedächtnis, Sucht und Plastizität	8
1.4. Grundlagen von Lernmodellen	11
1.5. Ziel und zentrale Fragestellung der Arbeit	13
2. Material und Methoden	
2.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen	15
2.2. Substanzen	15
2.3. Lernmodelle	
2.3.1. Aktive bedingte Vermeidungsreaktion: Shuttle-Box	16
2.3.2. Hell-Dunkel-Diskriminierungsreaktion: Y-Kammer	18
2.4. Motilitätstest	20
2.5. Naive und chronisch vorbehandelte Tiere	21
2.6. Statistik	23
3. Ergebnisse	
3.1. Naive Tiere	
3.1.1. Morphin und naive Tiere	24
3.1.2. Etonitazen und naive Tiere	27
3.1.3. Naloxon (prä-Training) und naive Tiere	30
3.1.4. Naloxon (post-Training) und naive Tiere	32
3.2. Vorbehandelte Tiere	
3.2.1. Morphin vorbehandelte Tiere	
3.2.1.1. Kurzzeit-Intervall: 4 - 5 Wochen nach Ende der Vorbehandlung	36
3.2.1.2. Langzeit-Intervall: 10 - 16 Wochen nach Ende der Vorbehandlung	42
3.2.2. Etonitazen vorbehandelte Tiere	
3.2.2.1. Kurzzeit-Intervall: 5 Wochen nach Ende der Vorbehandlung	48
3.2.2.2. Langzeit-Intervall: 10 Wochen nach Ende der Vorbehandlung	54
4. Diskussion	56
5. Zusammenfassung	69
6. Literaturverzeichnis	71
7. Danksagung	78
8. Erklärung	79
9. Darstellung des Bildungsweges	80

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ANOVA	Varianzanalyse
BDNF	brain derived neurotropic factor
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
°C	Grad Celsius
CREB	cAMP response element-binding protein
CRH	Corticotropin-freisetzendes Hormon
DAMGO	Ala ² -MePhe ⁴ -Glyol ⁵ -Enkephalin
DOP	δ-Opioidrezeptor
F	Freiheitsgrad
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GABA	Gammaaminobuttersäure
GnRH	Gonadotropin-freisetzendes Hormon
GRH	Wachstumshormon
Hz	Hertz
i.p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KOP	κ-Opioidrezeptor
LH	luteinisierendes Hormon
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
lx	Lux
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
n	Anzahl
MOP	μ-Opioidrezeptor
μg	Mikrogramm
NaCl	Kochsalz

NOP	Nociceptinrezeptor
p	Fehlerwahrscheinlichkeit
RI	Retentionsindex
RL	Relearning
s	Sekunde
s.c.	subcutan
SEM	Standardfehler
TR	Training
X	Mittelwert

1. Einleitung

1.1. Geschichte der Opioide und ihre physiologischen Wirkungen

Opioide sind seit langem bekannte Inhaltsstoffe diverser Pflanzenarten und finden seit mehreren tausend Jahren in verschiedensten Kulturen sowohl als berauschende Drogen als auch therapeutische Strategien Anwendung.

Erste Beschreibungen finden sich bereits vor etwa 6000 Jahren bei den Sumerern. Araber brachten das Opium, einen Extrakt aus Schlafmohn, seinerzeit in den Orient, von wo aus es im Mittelalter seinen Weg nach Europa fand.

Im 19. Jahrhundert gelang es erstmals, aus dem Opium eine Reinsubstanz darzustellen, welches als Morphin bezeichnet wurde, nach Morpheus, dem griechischen Gott des Schlafes. Weitere Alkaloide konnten in der Folgezeit erfolgreich isoliert werden.

Sowohl die therapeutisch erwünschten schmerzstillenden Wirkungen als auch die unerwünschten berauschenden und suchterzeugenden Effekte dieser Substanzen waren seit langem bekannt. Im Laufe der Jahrhunderte wuchs die Erkenntnis, dass Opioide großen Einfluss auf physiologische Abläufe besitzen. Dies führte zu intensiver Suche nach entsprechenden zentralen und peripheren Bindungsstellen im menschlichen und tierischen Körper (1).

In den 1970er Jahren ließen sich dann erstmals Opioidrezeptoren nachweisen (2,3,4,5). Bis heute sind von ihnen vier Subtypen beschrieben worden: μ - (MOP), κ - (KOP), δ - (DOP) und Nociceptin- (NOP) Rezeptoren. Der wichtigste Vertreter ist MOP, da über diesen die große Mehrheit therapeutisch angewandter Opioide wirkt.

Die Entdeckung endogener Bindungsstellen ließ vermuten, dass auch ein entsprechendes endogenes Opioidsystem existieren müsste. Der Nachweis gelang in den folgenden Jahren (6,7). Bis heute konnten drei verschiedene Klassen endogener Liganden beschrieben werden: Endorphine, Dynorphine und Enkephaline (1,8).

Die Bedeutung des sehr komplexen endogenen Opioidsystems kann nicht allein in seiner schmerzstillenden Wirkung auf das Individuum im Falle einer Verletzung oder eines krankhaften Zustandes liegen. Da aus den Untersuchungen mit exogenen Opioiden bereits zahlreiche Wirkungen auf die

Physiologie beobachtet worden waren, lag der Schluss nahe, dass ein körpereigenes Opioidsystems eine Vielzahl physiologischer Wirkungen beeinflussen und modulieren müsste.

Heute wissen wir, dass Endorphine, Dynorphine und Enkephaline tatsächlich großen Einfluss auf die natürlichen Abläufe im Körper nehmen. Da diese Wirkungen allesamt über Opioidrezeptoren vermittelt werden, gilt Gleiches auch für exogen zugeführte Opioide.

Die analgetische Komponente steht dabei im Vordergrund. Eng verknüpft mit dieser Wirkung sind auch Veränderungen der Stimmung und des Erlebens. So wirken Opioide typischerweise dosisabhängig euphorisierend oder beruhigend und aktivieren das körpereigene Belohnungssystem.

Veränderungen auf hypothalamischer Ebene bewirken eine Sollwertverstellung des Thermoregulationszentrums, was in der Regel zu einem Absinken der Körpertemperatur führt. Dies ist eher ein Effekt endogener Opioide. Unphysiologisch hohe exogene Opioiddosen, wie sie im Rahmen therapeutischer Interventionen notwendig sind, können die Temperatur erhöhen.

Bedeutsam ist auch der Einfluss auf Zentren des Hirnstammes, wo Opioide unter anderem das Atemzentrum modulieren. Durch eine herabgesetzte Empfindlichkeit auf den CO₂-Partialdruck des Blutes wird der Atemantrieb gehemmt. Die für Opioide typische hustenstillende Wirkung wird offenbar nicht über diesen Weg vermittelt. Es scheint ein medulläres Hustensystem zu existieren, welches direkt moduliert werden kann. Besonders empfindlich für opioide Einflüsse ist die Chemorezeptortriggerzone der Area postrema im verlängerten Mark. Hier können Übelkeit und Erbrechen induziert werden, während das übergeordnete Brechzentrum durch höhere Dosierungen gehemmt wird.

Das opioide System beeinflusst darüber hinaus vielfältig neuroendokrine Prozesse. Die Freisetzung von GnRH und CRH wird gehemmt, was zu verminderten Plasmakonzentrationen von LH, FSH und ACTH führt. Andererseits werden Prolactin und GRH vermehrt freigesetzt (1).

Da Opioidrezeptoren in großem Maße in der Peripherie vorhanden sind, kommt es auch dort zu direkten Modulationen. So wird die glatte Muskulatur je nach gewebespezifischer Rezeptorverteilung ganz unterschiedlich beeinflusst. In

Blutgefäßen kommt es durch Relaxation der Muskelzellen zu einer Verminderung des peripheren Widerstandes. Im Gastrointestinaltrakt sowie in der Harnblase reagiert die glatte Muskulatur mit Kontraktionen, welche selbst bei therapeutischen Opioiddosierungen zu Spasmen und Obstipation führen können.

Bemerkenswert ist auch der Einfluss endogener und exogener Opioide auf das Immunsystem. Diese Effekte sind sehr komplex und werden gegenwärtig intensiv untersucht.

Es kann davon ausgegangen werden, dass das endogene Opioidsystem eine große Rolle in physiologischen Regulationen spielt, wobei sicher noch längst nicht alle Aspekte möglicher Wirkungen beleuchtet worden sind.

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang der Einfluss auf Lernen und Gedächtnis. Auf diesem Gebiet ist eine Vielzahl an Studien durchgeführt worden mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen. Im Folgenden soll ein kleiner Überblick dieser Thematik gegeben werden.

1.2. Opioideneinfluss auf Lernen und Gedächtnis

Die neuroanatomischen und -physiologischen Grundlagen von Lernen und Gedächtnis sind ausgesprochen komplex und seit Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Bis heute ist nur teilweise bekannt, wie bestimmte Substanzen auf Lernen und Gedächtnis Einfluss nehmen können.

Bereits um 1900 wurde vermutet, dass neu gewonnene Erinnerungen gefestigt werden müssen, um dauerhaft abrufbar zu sein. Dieser als Konsolidierung bezeichnete Prozess ist störanfällig. Es konnte in damaligen Studien gezeigt werden, dass die Erinnerung frisch erlernter Informationen verhindert wurde, wenn der Proband bereits kurz nach dem Aneignen dieser Originalinformationen neue Sachverhalte lernte. Es lag der Schluss nahe, dass neue Erinnerungen eine gewisse Zeit lang instabil bleiben, bevor sie dauerhaft abgespeichert werden (9).

Der Ausbildung des sogenannten Langzeitgedächtnisses scheinen dabei strukturelle Veränderungen in Form neuronaler Plastizität zugrunde zu liegen, während Kurzzeitgedächtnisinhalte wahrscheinlich eher funktionell gespeichert werden (10).

Eine wichtige Voraussetzung für Lernen ist Motivation. Dies kann zum Beispiel das Erreichen lebenswichtiger Faktoren sein, wie Wasser, Futter, Paarungsmöglichkeiten oder Territorium, die mit einem positiven Feedback verbunden sind, was zu einer Veränderung von Verhalten führt. Andere Faktoren wie Fraßfeinde oder Giftpflanzen sind mit einem negativen Feedback assoziiert, welches ebenfalls das Verhalten spezifisch moduliert (11). Als Feedback kann in diesem Zusammenhang die Induktion positiver oder negativer Emotionen verstanden werden. Negative Emotionen werden eher mit einem Vermeidungsverhalten assoziiert sein. Positive Emotionen führen dagegen eher zu einer Verstärkung eines bestimmten Verhaltens, das zu diesen Emotionen im Sinne einer Belohnung geführt hat (12).

Da die für die Gedächtnisbildung so wichtige Konsolidierung eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt, besteht die Möglichkeit, die Informationsspeicherung in diesem Zeitraum zu modulieren und mit den beschriebenen Emotionen und Erfahrungen zu verknüpfen. Stark emotionell eingefärbte Gedächtnisinhalte werden in der Regel besser erinnert als weniger gefühlsintensive. In diesem Zusammenhang steht auch der Einfluss diverser stimmungsbeeinflussender Substanzen auf die Gedächtnisbildung. So verbessern beispielsweise typische Stressmediatoren wie Adrenalin oder Glucocorticoide die Gedächtnisbildung (13,14).

Eine zentrale Rolle in diesem System spielt die Amygdala. Sie stellt eine wichtige neuronale Struktur im Zusammenhang mit emotionellem Erleben dar. Dabei ist ihre intakte Funktion nicht zwingend Voraussetzung für eine erfolgreiche Konsolidierung. Allerdings zeigt sich, dass Speichervorgänge in höheren Hirnzentren durch neuronale Projektionen, die ihren Ursprung in der Amygdala haben, moduliert und reguliert werden (9).

Der Einfluss verschiedener Substanzen auf diese Vorgänge ist intensiv untersucht worden. So ist bekannt, dass die Aktivierung β -adrenerger Rezeptoren in der Amygdala mittels Adrenalin oder anderer β -Agonisten zu einer Verbesserung des Lernens führt, während β -Antagonisten das Gegenteil bewirken (15). Dabei scheint die Freisetzung des intraamygdalen Noradrenalins eine entscheidende Rolle in der modulatorischen Wirkung auf Konsolidierungsvorgänge zu spielen (16). Offenbar sind die Effekte auf das Lernen abhängig von der eingesetzten Substanzkonzentration. Wird Adrenalin

in niedrigen bis moderaten Dosen appliziert, zeigt sich eine Retentionsverbesserung wie beschrieben. In hohen Dosen verkehrt sich die Wirkung jedoch ins Gegenteil (17).

Neben dem noradrenergen spielt das cholinerge System eine wichtige Rolle für Lernen und Gedächtnis. Aus dem Verständnis der Pathophysiologie der Alzheimer-Erkrankung weiß man, dass ein Untergang cholinergischer Neurone im Nucleus basalis Meynert und im Septum zu kognitiven Defiziten führt. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Funktion des cholinergen Systems mit steigendem Alter generell nachlässt (18).

Die positive Wirkung von Acetylcholinesterasehemmstoffen auf bestimmte Lernaufgaben unterstützt die Annahme, die Gedächtnisleistung durch eine Erhöhung der cholinergen Neurotransmission verbessern zu können (19). Vergleichbare Ergebnisse finden sich bei Untersuchungen mit direkten cholinergen Agonisten (20). Im Umkehrschluss müssten cholinerge Antagonisten Lern- und Gedächtnisvorgänge verschlechtern. Entsprechende Untersuchungen konnten dies belegen (21).

Noradrenerges und cholinerges System sind hinsichtlich der Beeinflussung kognitiver Fähigkeiten eng miteinander verknüpft. Es wurde gezeigt, dass der retentionsverbessernde Effekt von Adrenalin durch Gabe von Atropin aufgehoben werden kann. Darüber hinaus antagonisierte der Cholinesteraseinhibitor Physostigmin die retentionsverschlechternde Wirkung hoher Adrenalin Dosen (22).

Weitere Neurotransmitter scheinen an den komplexen Vorgängen der Gedächtnisbildung und -speicherung beteiligt zu sein. Es ist nachgewiesen, dass beispielsweise GABA-Agonisten zu einer Retentionsverschlechterung führen, möglicherweise im Zusammenspiel mit hemmenden Einflüssen auf die neuronale Acetylcholinfreisetzung im Nucleus basalis Meynert (23). GABA-Antagonisten führen dagegen zu einer Verbesserung des Lernens (24).

Von großem Interesse scheint weiterhin die Beteiligung neuronaler Peptide an der Konsolidierung zu sein. Substanz P führt beispielsweise zu einer Verbesserung des Gedächtnisses in diversen Lernversuchen (25). Ein Zusammenhang mit dem cholinergen System scheint gesichert (26,27). Der Befund, dass der retentionsverbessernde Effekt von Substanz P durch den Opioidantagonisten Naltrexon verhindert werden kann, legt den Schluss nahe,

dass das opioide System eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang spielt (28).

Opioidpeptide werden sowohl zentral als auch peripher freigesetzt, wenn sich das Individuum in einer Stresssituation befindet (29,30). Dabei wird Enkephalin gemeinsam mit Adrenalin aus der Nebenniere ausgeschüttet, wohingegen β -Endorphin aus Hypophyse und Hypothalamus freigesetzt wird (31,32). Zahlreiche Untersuchungen an Ratten und Mäusen zeigen, dass die Gedächtnisretention durch Opioidagonisten und -antagonisten beeinflusst wird, wenn sie direkt nach definierten Lernversuchen appliziert werden. Die Effekte sind sowohl dosis- als auch zeitabhängig und zeigen sich bei systemischer und zentraler Applikation. Es wurde geschlussfolgert, dass endogen freigesetzte Opioidpeptide Konsolidierungsprozesse modulieren und damit die Gedächtnisbildung beeinflussen (33,34).

Nachdem 1975 erstmals eine opioidinduzierte Retentionsverschlechterung an Mäusen nachgewiesen wurde, folgte eine Reihe entsprechender Untersuchungen in verschiedenen Lernversuchen mit diversen Substanzen. Die verschlechternde Wirkung der Opioidagonisten auf das Gedächtnis ließ sich bei diesen Untersuchungen stets durch Opioidantagonisten aufheben (35). Darüber hinaus wurde in einigen Versuchen gezeigt, dass die alleinige Gabe eines Opioidantagonisten nach einem entsprechenden Lernversuch die Retention signifikant verbessern konnte (36,37,38).

Interessant ist die Erkenntnis, dass neue Erfahrungen offenbar eine Freisetzung von β -Endorphin induzieren können (39). Dies könnte auch einen möglichen retentionsverbessernden Effekt des MOP-Antagonisten Naloxon erklären. So verbesserte sich in einigen Arbeiten das Lernen in diesem Zusammenhang nur dann, wenn die Lernumgebung vollkommen unbekannt für das Versuchstier war. Wenn das Tier hingegen die Umgebung bereits kennen gelernt hatte, blieb Naloxon ohne Wirkung auf die Retention (40). β -Endorphin wird möglicherweise nur in solchen Situationen vermehrt freigesetzt, in denen die Lernbedingungen neu sind. Bemerkenswert ist, dass beispielsweise Adrenalin im Gegensatz zu Naloxon auch in für das Tier bekannten Situationen die Retention verbessern kann (41). Andere Untersuchungen zeigten jedoch keine Verbesserung des Gedächtnisses nach Naloxonapplikation, sondern eher eine dosisabhängige Verschlechterung (42).

Im Zusammenspiel von adrenergen und opioiden Substanzen scheint es ein gemeinsames Target zu geben – die Modulation der neuronalen NoradrenalinKonzentration. Dabei vermindern Opiode die Freisetzung von Noradrenalin, während β -Adrenozeptoragonisten den gegenteiligen Effekt zeigen (15,43). Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Tatsache, dass der β -Adrenozeptorantagonist Propranolol die positive Wirkung von Naloxon auf das Lernen aufhebt (44).

Die Retentionsverbesserung von Adrenalin und Naloxon kann verhindert werden, wenn eine Läsion in der Stria terminalis gesetzt wird, einer zentralen Lernstruktur der Amygdala (45,46). Es zeigt sich, dass die Amygdala offenbar von immenser Bedeutung für die Modulation neuer Lerninhalte ist. Unterstützt wird diese Erkenntnis durch die Befunde, dass intraamygdale Applikationen von Adrenalin und Naloxon stark retentionsverbessernd wirken (35). Injektionen der beiden Substanzen in andere Hirnregionen wie Nucleus caudatus, Putamen und dorsoamygdaler Kortex verbesserten hingegen das Lernen nicht (47).

Neben dem noradrenergen und cholinergen spielt das dopaminerge Neurotransmittersystem eine wichtige Rolle in der Modulation sich formender Gedächtnisinhalte. Dabei konnte gezeigt werden, dass offenbar eine direkte Beeinflussung durch Opiode gegeben ist, welche die Dopaminfreisetzung hemmen und somit Lernen und Gedächtnis verschlechtern. Umgekehrt kann durch Opioidantagonisten eine Disinhibition erreicht werden, die durch eine erhöhte Dopaminfreisetzung zur Verbesserung kognitiver Fähigkeiten führt. Es scheint einen trineuronalen Pfad zu geben, der aus einem Neuron besteht, welches Opioidpeptide freisetzt, die ihrerseits auf ein dopaminerges Neuron Einfluss nehmen, das dann direkt zu einem dritten Neuron projiziert, welches die Gedächtnisbildung moduliert. Parallel dazu geht man davon aus, dass ein solches System auch für Noradrenalin existiert, welches dann das Dopamin am zweiten Neuron ersetzt. Wo die beschriebenen trineuronalen Systeme anatomisch genau lokalisiert sein sollen, ist allerdings unklar (48).

Neue Daten legen den Schluss nahe, dass Opiode möglicherweise auch durch neurotoxische Effekte Lern- und Gedächtnisprozesse stören könnten. Sowohl chronisch appliziertes Heroin als auch Methadon sind beispielsweise in der Lage, die Expression proapoptotischer Proteine im Kortex und Hippocampus

von Mäusen hoch zu regulieren, mit gleichzeitiger Störung kognitiver Leistungen (49,50).

Opioide Effekte auf Lernen und Gedächtnis sind nicht nur im Tierversuch nachweisbar, sondern treten auch im klinischen Alltag an Patienten in Erscheinung. Wir wissen heute, dass Opioide wie Morphin bei akuter Anwendung auch am Menschen eine retro- und anterograde Amnesie induzieren können (51). Erstaunlicherweise sind solche Wirkungen möglicherweise geschlechtsabhängig. In einer kleinen Studie mit freiwilligen Probanden konnte gezeigt werden, dass Frauen in einem Versuch zur Testung des Arbeitsgedächtnisses sowohl durch Morphin als auch Hydrocodon beeinträchtigt wurden, Männer hingegen jedoch nur durch Morphin (52).

Während amnestische Effekte bei akuter Opioidindikation durchaus wünschenswert sein können, werden chronisch behandelte Patienten dadurch eher beeinträchtigt. Die vorliegenden Daten aus in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen zeigen, dass viele Fragen noch unbeantwortet sind und unterstreichen die Wichtigkeit der weiteren Erforschung neurophysiologischer opioider Effekte.

1.3. Gedächtnis, Sucht und Plastizität

Opioide sind bekannt für ihre suchtinduzierenden Eigenschaften. Es wird vermutet, dass ein einziger Kontakt mit einer abhängigkeiterzeugenden Substanz unter Umständen lebenslange Verhaltensveränderungen verursachen kann (53). Daher liegt der Schluss nahe, dass für das Entstehen einer Sucht Lernprozesse bedeutsam sind.

Die Erforschung der neurobiologischen Grundlagen von Lernen, Gedächtnis und Sucht ist allerdings lange Zeit getrennt betrachtet worden. So wurde das mesolimbische dopaminerge System als entscheidende neuronale Zielstruktur abhängigkeiterzeugender Substanzen angesehen, die die neuronale Plastizität verändern und so Sucht verursachen können. Dieses System umfasst dopaminerge Neurone in der ventralen tegmental Area des Mittelhirns, die verschiedene Strukturen des Vorderhirns innervieren, insbesondere den Nucleus accumbens (54,55).

Im Gegensatz dazu wurde in der Lern- und Gedächtnisforschung primär auf Strukturen fokussiert wie Hippocampus, Amygdala und zerebraler Kortex, die

als entscheidende Hirnregionen gelten, in denen neuronale Plastizität für Lernen und Gedächtnis verantwortlich gemacht wird (56,57).

Trotz der Tatsache, dass die Erforschung der Bereiche Lernen, Gedächtnis und Sucht lange Zeit auf unterschiedliche Hirnregionen gerichtet war, ist es beeindruckend, dass dieselben beobachteten molekularen und zellulären Veränderungen innerhalb dieser Systeme sowohl mit Lernen und Gedächtnis als auch mit Sucht in Verbindung stehen, sodass eine getrennte Betrachtung als überholt gilt (58).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über diese Mechanismen.

Sucht (ventrale tegmentale Area - Nucleus accumbens)	Lernen und Gedächtnis (Hippocampus, Kortex, Amygdala)
synaptische Plastizität: LTP, LTD BDNF-Signalkaskaden: begünstigen Verhaltens-effekte von Cocain morphologische Veränderungen an Dendriten Glutamat-Rezeptoren: Veränderungen der Rezeptorzahl intrazelluläre Signalwege: cAMP vermittelt Substanz- abhängigkeit CREB: vermittelt Substanzabhängigkeit	synaptische Plastizität: LTP, LTD BDNF-Signalkaskaden: begünstigen LTP und Lernen morphologische Veränderungen an Dendriten Glutamat-Rezeptoren: Veränderungen der Internalisierung und Phosphorylierung intrazelluläre Signalwege: cAMP begünstigt LTP CREB: begünstigt LTP und Gedächtnis

Tabelle 1: Beispiele gemeinsamer molekularer und zellulärer Grundlagen von Sucht und Gedächtnis

(in Anlehnung an Nestler, E.J., 2002)

LTP: Langzeitpotenzierung; LTD: Langzeitdepression; BDNF: brain-derived neurotrophic factor; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; CREB: cAMP-response element binding protein

Zu den am besten untersuchten zellulären Korrelaten von Lernen und Gedächtnis zählen die Langzeitpotenzierung (LTP) und die Langzeitdepression (LDP), insbesondere an glutamatergen und dopaminergen Synapsen als Formen der aktivitätsabhängigen synaptischen Plastizität (11,53,59). Sie sind intensiv an Hippocampus und Amygdala untersucht worden und haben das Verständnis der neuronalen Veränderungen auf molekularer Basis deutlich geprägt (60,61).

Suchterzeugende Substanzen beeinflussen LTP und LTD an glutamatergen Synapsen in der ventralen tegmental Area und dem Nucleus accumbens, die als wichtige neuronale Strukturen bei der Entstehung von Abhängigkeit eine Rolle spielen (62,63). Zusätzlich wurde gezeigt, dass solche Substanzen LTP und LDP auch an glutamatergen Synapsen in Hirnregionen modulieren, die eher mit Gedächtnis und Lernen in Verbindung gebracht werden, wie beispielsweise der Hippocampus (58).

Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Wirkung von Opioiden als bekannte suchterzeugende Substanzen. So konnte beispielsweise in der CA1-Region des Hippocampus gezeigt werden, dass sowohl Morphin als auch Heroin nach chronischer Anwendung zu einer reduzierten LTP führen. Nach erneuter Applikation der korrespondierenden Substanzen im Entzugsintervall wurde die LTP wiederhergestellt. Interessanterweise konnte akut gegebenes Morphin auch in heroinabhängigen Tieren die reduzierte LTP wiederherstellen. Heroin war umgekehrt allerdings nicht in der Lage die verringerte LTP von morphinabhängigen Tieren zu beeinflussen. Das MOP-selektive Peptid DAMGO stellte in beiden vorbehandelten Gruppen die LTP wieder her (64). Diese Ergebnisse demonstrieren eindrucksvoll, dass die eingesetzten Opioide durchaus unterschiedliche Effekte auf Lernen und Gedächtnis haben können, selbst wenn sie zur gleichen Substanzklasse mit vergleichbaren molekularpharmakologischen Wirkungen gehören.

Neben der Verringerung einer LTP nach chronischer Morphinapplikation kann ebenso das Ausmaß einer LTD im Hippocampus vermindert werden (65). Weitere Strukturen, in denen die synaptische Plastizität durch Opioide moduliert wird, sind beispielsweise die Amygdala (66), der präfrontale Kortex (67) sowie die ventrale tegmentale Area (68), die als wichtige Struktur in der Suchtentstehung gilt. Opioide greifen demnach an neuronalen Strukturen an, die bislang häufig für Lernen und Gedächtnis sowie für Abhängigkeit getrennt betrachtet wurden. Es zeigt sich jedoch an der Wirkungsweise vieler Substanzen, dass die genannten Systeme stark konvergieren (58,69).

So können suchterzeugende Substanzen positive oder negative Emotionen hervorrufen, die als starke Motivation für ein bestimmtes Verhalten angesehen werden. Diese künstlich induzierten Gefühle entsprechen unter Umständen denen, die normalerweise als Antwort auf natürliche Stimuli gebildet werden

und können dann womöglich ersatzweise Lern- und Gedächtnisprozesse beeinflussen (12).

Abbildung 1 gibt einen Überblick zu diesen Überlegungen.

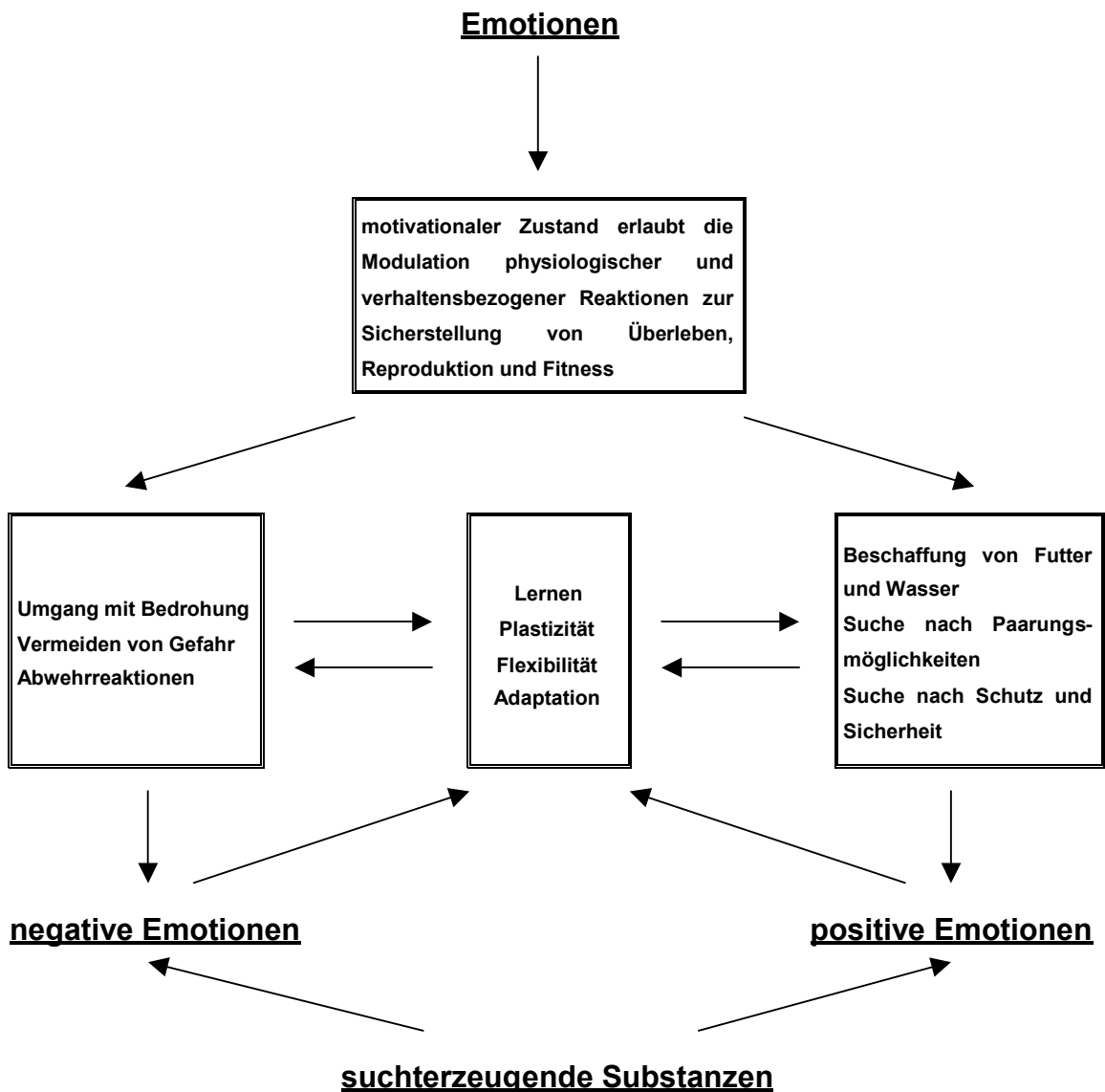


Abb. 1: Zusammenhang zwischen suchterzeugenden Substanzen, Emotionen, Motivation und Lernen
(in Anlehnung an Nesse & Berridge 1997)

1.4. Grundlagen von Lernmodellen

Der Erwerb von Informationen und deren Abruf kann mithilfe von Lernmodellen untersucht werden. In der Regel bestehen solche Modelle funktionell aus zwei Versuchseinheiten. In einem Training wird durch Darbietung bestimmter Reize eine Verhaltensveränderung induziert. Solche Reize können eine positive Motivation im Sinne einer Belohnung oder eine negative Motivation in Form von Bestrafung darstellen. Die Akquisition von Informationen im Training ist Ausdruck des Lernens. Diese neu erworbenen Informationen müssen

konsolidiert werden, um später wieder abgerufen werden zu können. Ein zweiter Test, der nach einem definierten Zeitraum stattfindet, wird als Relearning bezeichnet. Hier wird der Abruf der vorher erlernten Informationen überprüft und ist Ausdruck des Gedächtnisses (70).

Lernmodelle, die auf positiver Motivation basieren, benötigen erfahrungsgemäß mehrere Trainingssitzungen, um eine messbare Verhaltenveränderung zu induzieren. Soll der Einfluss von Substanzen auf Lernen und Gedächtnis überprüft werden, ergibt sich das Problem, wann bei solchen positiv-motivierten Modellen am besten die Substanzapplikation erfolgt. Prinzipiell kann dies vor oder nach jeder Trainingssitzung stattfinden. Die Beurteilung der Substanzeffekte gestaltet sich dann sehr schwierig, da nicht abgeschätzt werden kann, ab wann ein Wirkstoffeinfluss tatsächlich erfolgt ist. In einem solchen Fall ist eher der Einsatz von Lernmodellen geeignet, die auf negativer Motivation im Sinne aversiver Reize beruhen. Sie bieten den Vorteil, dass häufig eine einzige Trainingssitzung genügt, um messbare Verhaltensveränderungen hervorzurufen. Allerdings stellt sich auch hier die Frage, ob die zu untersuchende Substanz vor oder nach dem Training appliziert werden soll. Erfolgt die Gabe vor dem Training, treten Interpretationsschwierigkeiten auf, da dann die Akquisition selbst beeinflusst wird. Bei Opioiden verbietet sich ein solches Vorgehen schon allein deshalb, weil ihre analgetische Wirkung die aversiven Reize (in der Regel Stromreize) abschwächt. Darüber hinaus wirken diese Substanzen stark sedierend, sodass das Verhalten der Tiere im Training unspezifisch negativ beeinflusst wird und die Ergebnisse daher wenig aussagekräftig sind. Soll das Tier aber beispielsweise über einen längeren Zeitraum mit Opioiden vorbehandelt werden, um chronische Effekte zu überprüfen, so ist darauf zu achten, nach dem Ende der Vorbehandlung erst ein gewisses Abstinenzintervall abzuwarten, damit die Tiere nicht in einem Zustand des akuten Entzuges trainiert werden (70).

Typische Lernmodelle mit negativer Motivation sind zum Beispiel die Shuttle-Box zum Erlernen einer klassisch bedingten Vermeidungsreaktion, sowie die Y-Kammer zum Erlernen einer Hell-Dunkel-Diskriminierung.

1.5. Ziel und zentrale Fragestellung der Arbeit

Das opioide System ist in seiner Rolle auf Lernen und Gedächtnis in den vergangenen Jahren schon sehr intensiv untersucht worden. Allerdings sind trotz der Vielfalt an vorliegenden Studien die Ergebnisse zum Teil widersprüchlich.

So wurde in einigen Arbeiten stets eine akute Lernverbesserung durch den Opioidantagonisten Naloxon beschrieben (38), in anderen Untersuchungen war dieser Effekt kontextabhängig (40). Einige Autoren beschreiben sogar dosisabhängige Verschlechterungen (42). Allerdings wurden bei diesen Untersuchungen jeweils unterschiedliche Lernmethoden bei ein und derselben Fragestellung herangezogen.

Weiterhin herrscht Unklarheit über die Bedeutung einer chronischen Opioidapplikation in Hinsicht auf Lernen und Gedächtnis, insbesondere bei Substanzen mit unterschiedlichem Toleranz- und Abhängigkeitspotenzial.

Darüber hinaus ist bei akuter Opioidapplikation ohne chronische Vorbehandlung die Datenlage dürftig. Das Standardopioide Morphin ist beispielsweise gut untersucht hinsichtlich aktiv und passiv bedingter Vermeidungsreaktionen, nicht jedoch in Bezug auf Hell-Dunkel-Diskriminierungen. Für andere Opioide wie beispielsweise den hochspezifischen MOP-Agonisten Etonitazen existieren solche Daten überhaupt nicht.

Wir stellten uns daher mit dieser Arbeit die Aufgabe, die Rolle des Opioidsystems in Hinblick auf Lernen und Gedächtnis systematisch an etablierten Lernmodellen mit Opioidagonisten und -antagonisten unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen zu untersuchen. Dabei verwendeten wir den Opioidantagonisten Naloxon sowie die beiden Agonisten Morphin und Etonitazen. Der Grund für den Einsatz von zwei Opioiden war der Unterschied in ihren pharmakologischen Eigenschaften. So wurde gezeigt, dass Etonitazen auf molekularer Ebene eine MOP-Rezeptorinternalisierung bewirkt und eine geringe Toleranzentwicklung und Sensitivierung induziert, während Morphin, das ein schlechter Internalisierer ist, eine hohe Toleranzentwicklung und Sensitivierung erzeugt, was möglicherweise mit einem unterschiedlichen Abhängigkeitsrisiko einhergeht (71). Darüber hinaus ist Etonitazen das Opioid mit der höchsten bekannten MOP-Selektivität (72). Es sollte daher die Frage untersucht werden, ob solch unterschiedliche Substanzeigenschaften eine

zusätzliche Bedeutung für eine mögliche Beeinflussung von Lernen und Gedächtnis besitzen, sowohl an akuten als auch an chronisch vorbehandelten Tieren.

Für die Versuche wurden zwei Lernmodelle mit unterschiedlichen neurophysiologischen Grundlagen gewählt, um eine größere Allgemeingültigkeit der Ergebnisse zu erzielen. Beide Modelle basierten auf dem Prinzip einer negativen Motivation.

Wir verwendeten daher eine klassische bedingte Vermeidungsreaktion in der Shuttle-Box und eine Hell-Dunkel-Diskriminierung in der Y-Kammer. Weiterhin wurden sowohl die akuten Opioidwirkungen als auch die Effekte bei chronisch mit Opioiden vorbehandelten Tieren nach einer Abstinenzperiode untersucht.

Zusätzlich sollten chronisch vorbehandelte Tiere hinsichtlich Veränderungen ihrer Aktivität in einer Motilitätstestapparatur untersucht werden. Der akute Einfluss von Opioiden und des dopaminergen Agonisten Apomorphin auf diese vorbehandelten Tiere sollte dabei Einblicke in langanhaltende Veränderungen der Systeme gewähren. Dies ist von klinischem Interesse, da Opioide im humanmedizinischen Gebrauch häufig über lange Zeiträume gegeben werden.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- Wie wird die Gedächtniskonsolidierung durch Opioidagonisten und Antagonisten moduliert?
- Haben Opioidagonisten mit unterschiedlichen Eigenschaften wie Morphin und Etonitazen unterschiedliche Effekte auf die Gedächtnisretention?
- Ist die Beeinflussung der Gedächtnisretention in den beiden verwendeten Lernmodellen mit negativer Bekräftigung durch die Substanzen gleich?
- Zeigen mit den Opioiden chronisch vorbehandelte Tiere nach definierter Abstinenzzeit Veränderungen im Lernen oder in der Retention?
- Über welchen Zeitraum hinaus können Opioideffekte auf Lernen und Gedächtnis nachgewiesen werden?
- Können mögliche Veränderungen chronisch vorbehandelter Tiere in Bezug auf Lernen und Gedächtnis mit Veränderungen in der Aktivität opioider und dopaminerger Systeme korreliert werden und wie lange sind solche Effekte nachweisbar?

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für die Untersuchungen wurden männliche Wistar-Ratten verwendet, die bei Versuchsbeginn 8 Wochen alt waren. Das Gewicht der einzelnen Tiere betrug zwischen 250 und 350 g. Die Tiere wurden unter Standardlaborbedingungen gehalten. Die Umgebungstemperatur betrug 20–22°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55–65 %. Die Versuchstiere unterlagen einem 12-h-Hell-Dunkel-Rhythmus mit Hell-Phasen zwischen 6.00 und 18.00 Uhr. Standard-Futterpellets (Altromin®1326) und Wasser waren ad libitum verfügbar. Alle Versuchstiere wurden in Macrolon®IV-Käfigen zu je 5 Tieren pro Box gehalten. Grundsätzlich wurde jedes Tier immer nur in einem einzigen Lernversuch getestet.

2.2. Substanzen

Folgende Substanzen kamen bei den Versuchen zum Einsatz:

- Morphinhydrochlorid (Fa. Synopharm, Barsbüttel, Deutschland)
- Etonitazehydrochlorid (Fa. Novartis Pharma, Basel, Schweiz)
- Naloxonhydrochlorid (Fa. Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Apomorphinhydrochlorid (Fa. Teclapharm, Lüneburg, Deutschland)

Dabei wurden jeweils verschiedene Dosierungen und Applikationsformen verwendet (Tabelle 2):

Morphin	Etonitazen	Naloxon	Apomorphin
2,5 mg/kg KG s.c.		1 mg/kg KG i.p.	0,7 mg/kg KG s.c.
5 mg/kg KG s.c.	5 µg/kg KG s.c.		
10 mg/kg KG s.c.	10 µg/kg KG s.c.	10 mg/kg KG i.p.	

Tabelle 2: eingesetzte Substanzen, Konzentrationen und Applikationen

Die Testsubstanzen wurden in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, sodass zum Erreichen der gewünschten Dosis immer 1 ml/kg KG appliziert werden

mussten. Sämtliche Versuchsreihen wurden grundsätzlich mit Kontrollen verglichen, wobei physiologische Kochsalzlösung in einer Menge von 1 ml/kg KG zum Einsatz kam.

Etwas problematisch war die Kalkulation der optimalen Opioiddosen. Etonitazen ist etwa 1000fach stärker analgetisch wirksam als Morphin (73). Da die Analgesie eine gut untersuchte Größe ist und klinisch den bedeutendsten Parameter darstellt, mit dem Opioide charakterisiert werden, entschlossen wir uns, für die Lernversuche äquianalgetische Dosierungen von Morphin und Etonitazen einzusetzen. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass weitere Substanzeigenschaften, wie z. B. die Wirkung auf Parameter in verschiedenen Gedächtnistests, bei Etonitazen um den Faktor 1000 stärker ausgeprägt sind als bei Morphin (74,75). Daher erschienen uns Dosierungen im Milligrammbereich für Morphin und im Mikrogrammbereich für Etonitazen adäquat.

2.3. Lernmodelle

2.3.1. Aktive bedingte Vermeidungsreaktion: Shuttle-Box

Das Erlernen einer aktiven bedingten Vermeidungsreaktion wurde am Modell der Shuttle-Box überprüft. Sie ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

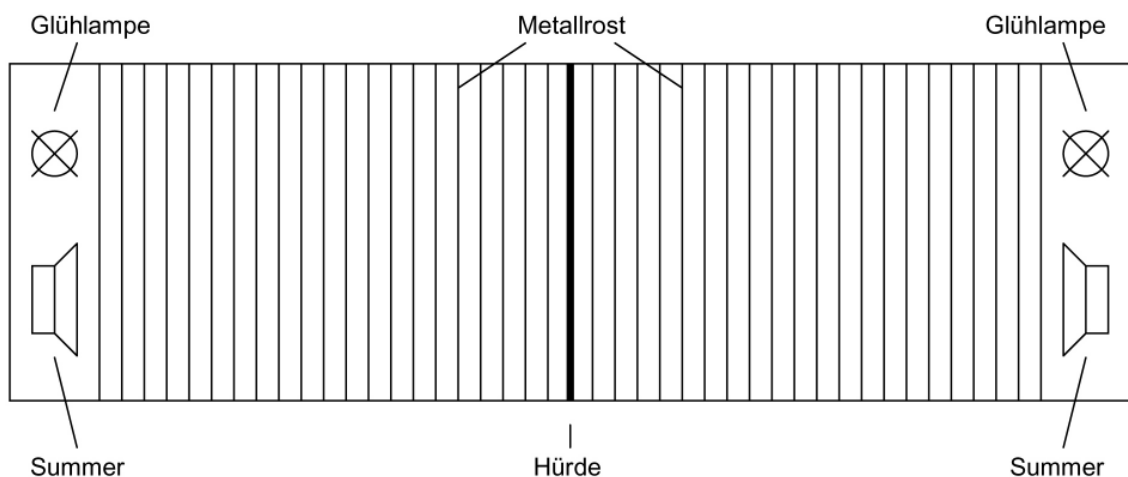


Abb. 2: schematische Darstellung der Shuttle-Box (Draufsicht)

In diesem Modell wird das Prinzip der klassischen Konditionierung genutzt. Dabei wird das Tier einem elektrischen Fußreiz (unbedingter Reiz) ausgesetzt und reagiert darauf mit einer Fluchtreaktion (unbedingte Reaktion). Der Fußreiz

wird dann mit einem Licht- und Tonsignal (bedingter Reiz) kombiniert. Die Koppelung von unbedingtem und bedingtem Reiz führt dazu, dass das Tier bereits bei der alleinigen Darbietung eines Licht- und Tonreizes eine Vermeidungsreaktion (bedingte Reaktion) zeigt. Ziel des Versuches ist es, dass das Tier lernt, nach Einsetzen eines Licht- und Tonreizes innerhalb von 4 s über die Hürde auf die beleuchtete Seite der Kammer zu wechseln, um einen verzögert applizierten elektrischen Fußreiz zu vermeiden.

Die für den Lernversuch verwendete Apparatur besteht aus einer 20 cm x 20 cm x 60 cm großen Kunststoff-Box, welche in zwei gleich große Kompartimente unterteilt ist, die durch eine 6 cm hohe Hürde von einander getrennt werden. Die Deckplatten enthalten je eine Glühlampe mit einer Leistung von 40 Watt. An den Stirnseiten befindet sich je ein elektrischer Summer, der ein akustisches Signal generieren kann. Der Boden besteht pro Seite aus 17 dicht nebeneinander angeordneten Metallstäben (Durchmesser: 0,5 cm), durch welche ein elektrischer Strom von maximal 1 mA geleitet werden kann. Die Hürde ist mit 2 Metalldrähten überzogen und kann gesondert elektrisch gereizt werden. Dies ist wichtig, um zu gewährleisten, dass die Tiere sich immer in einem der beiden Kompartimente aufhalten und nicht auf der Hürde sitzen bleiben.

Die Shuttle-Box selbst befindet sich zum Schutz der Tiere vor äußeren akustischen und visuellen Einflüssen unter einer Styroporabdeckung. Der Versuchsablauf gestaltete sich folgendermaßen:

Die Apparatur registriert, auf welcher Seite sich das Versuchstier gerade befindet. In stochastischen Intervallen, die im Mittel 30 s betragen, wird dem Tier im gegenüber liegenden Kompartiment ein kombinierter Licht- und Tonstimulus (bedingter Reiz) präsentiert. Nach einer Latenz von 4 s wird zusätzlich ein elektrischer Stromreiz (unbedingter Reiz) in dem Kompartiment appliziert, in welchem sich das Tier gerade aufhält. Überwindet das Versuchstier die Hürde (unbedingte Reaktion), so erlöschen sämtliche Stimuli. Dies wird als Sprung gewertet. Die Dauer der Stimulation aus bedingtem und unbedingtem Reiz beträgt maximal 20 s und wird als Lauf bezeichnet.

Eine Trainingseinheit besteht aus 60 Läufen. Sprünge, die während des bedingten Reizes (Licht + Tonsignal) stattfinden, also noch vor Einsetzen des Stromstimulus, werden als bedingte Reaktion gewertet. Ein Versuch gliedert

sich in ein Training sowie ein Relearning 24 Stunden später, welches in gleicher Weise wie das Training durchgeführt wird. Jedem Tier wird vor Testbeginn eine reizfreie Habituationszeit gewährt, die im Training 5 min und im Relearning 60 s beträgt.

Für die statistische Auswertung wurden die Anzahl der bedingten Reaktionen (< 4 s) sowie der Fluchtreaktionen (> 4 s; < 20 s) ermittelt und daraus der Retentionsindex errechnet. Dieser ist ein Maß der Gedächtnisleistung und errechnet sich nach folgender Formel:

$$RI [\%] = [(TR_{unbed} - RL_{unbed}) / TR_{unbed}] \times 100$$

RI = Retentionsindex

TR_{unbed} = unbedingte Reaktionen im Training (= 60 - bedingte Reaktionen im Training)

RL_{unbed} = unbedingte Reaktionen im Relearning (= 60 - bedingte Reaktionen im Relearning)

2.3.2. Hell-Dunkel-Diskriminierungsreaktion: Y-Kammer

Die Gedächtnisleistung für eine Hell-Dunkel-Diskriminierungsfähigkeit wurde am Modell der Y-Kammer überprüft. Sie ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

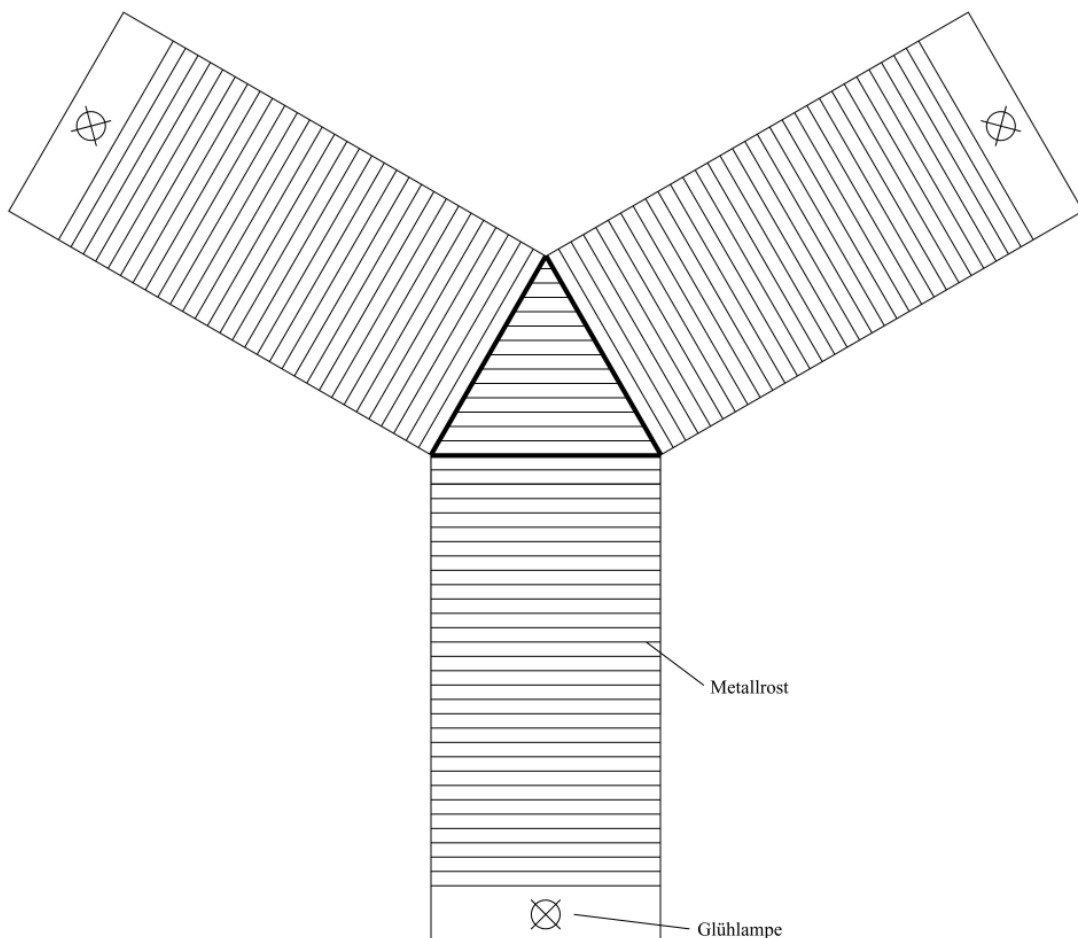


Abb. 3: schematische Darstellung der Y-Kammer (Draufsicht)

Hierbei handelt es sich um eine Apparatur, die aus drei länglichen Kunststoff-Boxen besteht (L: 40 cm, B: 20 cm, H: 17 cm), die in einem Winkel von jeweils 120° zueinander angeordnet sind. Alle Boxen stehen über ein Mittelteil in Verbindung. An den Stirnseiten eines jeden Armes befinden sich Lichtquellen. Der Boden der Y-Kammer besteht pro Teilbox aus 20 dicht nebeneinander angeordneten Metallstäben (Durchmesser: 0,5 cm), welche mit einem Strom versorgt werden können. Hierbei ist es möglich, jeden Arm sowie das Mittelteil einzeln mit Rechteckimpulsen von 50 Hz zu versorgen, wobei die Reizintensität individuell an die Empfindlichkeit des Versuchstieres angepasst wird, bis zu einer maximalen Stromstärke von 0,8 mA.

Ziel des Versuches ist, dass das Tier lernt, sofort nach Einsetzen eines elektrischen Fußreizes in den beleuchteten Arm der Kammer zu laufen. Der Versuchsablauf gestaltet sich folgendermaßen:

Die abgedunkelte Apparatur registriert, in welchem Kompartiment sich das Tier gerade aufhält. Der Versuch startet mit einer Beleuchtung einer der beiden anderen Arme. Gleichzeitig erhält das Tier einen elektrischen Fußreiz, dem es zu entfliehen versucht. Läuft das Tier dabei in den beleuchteten Arm (Zielarm), erlischt der Stromimpuls. Das Licht bleibt noch weitere 20 s aktiviert, damit das Tier die Beleuchtung mit dem straffreien Arm verknüpfen kann. Sucht das Tier allerdings zuerst den unbeleuchteten Arm auf, so dauert der elektrische Fußreiz an bis der Zielarm erreicht wurde. Nach spätestens 20 s erlöschen Licht und Stromreiz, um Stress zu vermindern. Die gesamte Zeit von Beginn bis Ende des Licht- und Tonstimulus wird als Lauf bezeichnet. Der Start der einzelnen Läufe erfolgt pseudostochastisch wobei die Zeitintervalle zwischen den Läufen im Mittel 60 s bei einer Variationsbreite von 30–90 s betragen.

An drei aufeinander folgenden Läufen ist immer das rechte Kompartiment, ausgehend von der Position des Tieres, der Zielarm. Das bedeutet, dass das Tier nach rechts in den beleuchteten Arm laufen muss, um den elektrischen Fußreiz zu beenden. Danach wird die Richtung des Zielarmes gewechselt. Es werden dann für die folgenden drei Läufe immer die linken Kompartimente, ausgehend von der Position des Tieres, beleuchtet. Dieser Rechts-Links-Wechsel ist wichtig, um ein einfaches Richtungslernen zu vermeiden. Es werden sowohl korrekte Läufe registriert (das sofortige Aufsuchen des

beleuchteten Armes), als auch korrekte Wechsel (das korrekte Aufsuchen des beleuchteten Armes vor und nach Richtungswechsel des Zielarmes).

Eine Testsitzung besteht aus 31 Läufen mit insgesamt 10 Richtungswechseln. Der Lernversuch gliedert sich in ein Training sowie ein Relearning, das 24 Stunden später in gleicher Weise wie das Training durchgeführt wird. Jedem Tier wird vor Versuchsbeginn eine reizfreie Habituationszeit zum Erkunden der Kammer gewährt, die im Training 10 min und im Relearning 60 s beträgt.

Im Gegensatz zur Shuttle-Box besteht bei der Y-Kammer für das Tier nicht die Möglichkeit, den Fußreiz zu vermeiden. Er kann allerdings durch korrekte Hell-Dunkel-Diskriminierung durch Flucht in das beleuchtete Kompartiment beendet werden.

Für die statistische Auswertung wurde aus den falschen Läufen in Training und Relearning der Retentionsindex ermittelt sowie die Differenz richtiger Wechsel (Zunahme richtiger Wechsel) analysiert. Der Retentionsindex errechnet sich nach folgender Formel:

$$RI [\%] = [(TR_{\text{Fehler}} - RL_{\text{Fehler}})/TR_{\text{Fehler}}] \times 100$$

RI = Retentionsindex

TR_{Fehler} = Fehler im Training

RL_{Fehler} = Fehler im Relearning

2.4. Motilitätstest

Die Aktivität wurde mithilfe einer Aktivitätsmessapparatur (MOTI®-Test-TSE, Bad Homburg, Deutschland) untersucht.

Es handelt sich dabei um eine nahezu kubische Kunststoff-Apparatur mit einer Größe von 47 cm x 47 cm x 50 cm. Die vollautomatisierte Box registriert mittels Infrarotzellen sowohl horizontale als auch vertikale Aktivitäten der Versuchstiere während eines Zeitraumes von insgesamt 15 min.

Die Apparatur erlaubt die Erfassung einer Vielzahl von Verhaltensparametern (insgesamt etwa 40), unter anderem die Gesamtaktivität (beinhaltet jede horizontale und vertikale Aktivität), den zurückgelegten Gesamtweg, die Anzahl der Aufrichtungen, die Aufenthaltszeit in der Mitte oder den zurückgelegten Weg in der Mitte. Wir beschränkten uns auf die Auswertung und Darstellung der Gesamtaktivität als einem wichtigen und aussagekräftigen Parameter zur Beschreibung der Motilität.

Dieser Parameter wurde in 5-Minuten-Intervallen analysiert. Dadurch ließen sich die Aktivitäten der Tiere über die vorgegebene Zeitspanne differenzierter beurteilen.

Wir unterteilten den MOTI®-Versuch in zwei Abschnitte: in eine Habituation und in einen Test. Während der Habituation wurde das Tier ohne Substanzeeinfluss für 15 min in der Apparatur belassen, um die Grundaktivität messen zu können. Direkt nach der Habituation wurde eine Substanz appliziert und im unmittelbar anschließenden Test die Aktivität erneut registriert. Um Veränderungen des opioden Systems zu erfassen, wurde entweder Morphin oder Etonitazen verabreicht. Für die Untersuchung von Veränderungen des dopaminergen Systems kam der Dopaminagonist Apomorphin zum Einsatz.

Die Beleuchtungsstärke betrug während der gesamten Versuche konstant 30 lx.

2.5. Naive und chronisch vorbehandelte Tiere

Zur Untersuchung der opioden Wirkung auf Lernen und Gedächtnis ist es wichtig, zwischen akuten und chronischen Effekten zu unterscheiden.

Akute Effekte wurden an naiven Tieren getestet. Diese erhielten eine definierte Dosis innerhalb von 5 min nach dem Training eines entsprechenden Lernversuches. Naive Tiere wurden ausschließlich in der Shuttle-Box und der Y-Kammer getestet.

Chronische Tiere wurden für die entsprechenden Versuche genau wie naive Versuchstiere behandelt. Der Unterschied bestand jedoch darin, dass sie vorher bereits für einen definierten Zeitraum mit einem Opioid behandelt wurden.

Die Versuche mit den chronischen Tieren wurden nicht sofort nach Beendigung der Opioidvorbehandlung durchgeführt, sondern erst nach einem vorher definierten Abstinenzzeitraum. Damit wurde vermieden, die Tiere in einem Stadium akuter Entzugssymptomatik zu untersuchen. Wir wollten dagegen überprüfen wie lange ein möglicher Effekt auf Lernen und Gedächtnis auch nach Beendigung der Behandlung anhält.

Für die chronische Vorbehandlung selbst wurden die Versuchstiere über einen Zeitraum von 4 Wochen täglichen Injektionen von 10 mg/kg KG Morphin oder 10 µg/kg KG Etonitazen ausgesetzt (jeweils mit Kochsalzapplikationen als

Kontrollen), wobei die Behandlung immer zwischen 7.00 und 9.00 Uhr stattfand. An den Wochenenden wurden keine Applikationen durchgeführt.

Daraus ergab sich folgendes Applikationsschema:

5 Tage Injektionen	2 Tage Pause	5 Tage Injektionen	2 Tage Pause	5 Tage Injektionen	2 Tage Pause	5 Tage Injektionen
-------------------------------	-------------------------	-------------------------------	-------------------------	-------------------------------	-------------------------	-------------------------------

Aus dieser chronischen Vorbehandlung ergaben sich 2 Gruppen:

- Mit Kochsalz vorbehandelte Tiere (NaCl-vorbehandelt) als Kontrollen
- Mit Opioid vorbehandelte Tiere (Morphin-/Etonitazen-vorbehandelt)

Beide Gruppen wurden nach einem definierten Abstinenzzeitraum in der Shuttle-Box, in der Y-Kammer und zusätzlich im MOTI®-System getestet. Dabei wurde zwischen einer Kurzzeit-Abstinenz (4-5 Wochen nach Ende der Vorbehandlung) und einer Langzeit-Abstinenz (10-16 Wochen nach Ende der Vorbehandlung) unterschieden. Während der Tests an den Lernmodellen wurden die vorbehandelten Tiere dann wieder wie naive Tiere behandelt. Das bedeutet, dass ein Teil der Tiere nach dem Training lediglich Kochsalz erhielt, während ein anderer Teil akut mit Morphin bzw. Etonitazen behandelt wurde. Daher bildeten sich neben den zwei vorbehandelten Gruppen weitere Untergruppen, die in Tabelle 3 dargestellt sind.

<u>Gruppe</u>	<u>Untergruppe</u>
NaCl-vorbehandelt	NaCl akut nach Training
	Morphin 10 mg/kg KG akut nach Training
Morphin-vorbehandelt	NaCl akut nach Training
	Morphin 10 mg/kg KG akut nach Training

<u>Gruppe</u>	<u>Untergruppe</u>
NaCl-vorbehandelt	NaCl akut nach Training
	Etonitazen 10 µg/kg KG akut nach Training
Etonitazen-vorbehandelt	NaCl akut nach Training
	Etonitazen 10 µg/kg KG akut nach Training

Tabelle 3: chronisch vorbehandelte Gruppen und akut behandelte Untergruppen

Es muss darauf hingewiesen werden, dass bei Lernversuchen an Shuttle-Box und Y-Kammer die eingesetzten Substanzen prinzipiell vor oder nach einem Training appliziert werden können. Wir hatten uns aus zwei Gründen bei den Opioiden gegen eine Applikation vor und für eine Verabreichung nach dem Training entschieden. Erstens haben sowohl Morphin als auch Etonitazen starke zentral-dämpfende Eigenschaften, die allein schon zu einer Störung der Trainingsleistung im Vergleich mit der Kontrollgruppe führen könnten, wenn sie vor dem Versuch gegeben werden würden. Zweitens ist die starke analgetische Wirkung der beiden Substanzen ungünstig für Lernversuche, in denen aversive Reize, wie Stromreize erforderlich sind, da diese unter Umständen mit geringerer Ausprägung wahrgenommen werden. Naloxon ist von dieser Problematik nicht betroffen, sodass es von uns zumindest an der Shuttle-Box sowohl vor als auch nach dem Training untersucht wurde.

2.6. Statistik

Für die statistische Auswertung wurde SPSS Version 18.0 für Windows genutzt. Dabei kamen verschiedene Tests zum Einsatz. Für den direkten Vergleich akuter Opioid- und Naloxoneffekte an naiven Tieren wurde der U-Test nach Mann-Whitney verwendet.

Für chronisch vorbehandelte Tiere wurde im direkten Gruppenvergleich ebenfalls der U-Test angewendet. Um mögliche akute Effekte in Abhängigkeit von der chronischen Vorbehandlung beurteilen zu können, kam eine Varianzanalyse (Two-way-ANOVA) zum Einsatz.

Vergleiche zwischen den unterschiedlichen Vorbehandlungsgruppen wurden mit dem U-Test durchgeführt. Um statistische Einflüsse auf einen Werteverlauf zu sichern, wurde eine Messwertwiederholung (repeated measures ANOVA) verwendet.

Als statistisch signifikant galt ein Ergebnis, wenn die Fehlerwahrscheinlichkeit $p < 0,05$ war.

3. Ergebnisse

3.1. Naive Tiere

3.1.1. Morphin und naive Tiere

Für die Lernversuche an der Shuttle-Box wurden 71 naive Tiere in einem Training getestet. Dabei mussten 60 Läufe absolviert werden. Sofort nach dem Training wurden die Leistungen ausgewertet und eine Einordnung der Tiere in vier verschiedene Gruppen vorgenommen mit der Maßgabe, dass alle Gruppen im Training vergleichbare Werte hinsichtlich bedingter Reaktionen zeigten. Dies ist wichtig, um leistungsstarke und leistungsschwache Tiere im Training auf alle Behandlungsgruppen möglichst gleichmäßig zu verteilen. Eine Randomisierung durfte also nicht erfolgen, da die Substanzapplikation erst nach dem Training erfolgte. Entsprechend ihrer Zuordnung wurden die Tiere unmittelbar nach ihrem Training mit Kochsalz oder Morphin in drei Dosierungen behandelt (2,5 mg/kg KG, 5 mg/kg KG oder 10 mg/kg KG). Nach 24 Stunden erfolgte das Relearning. Es wurden sowohl die bedingten Reaktionen als auch die Retentionsindizes ausgewertet. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 4 dargestellt.

Anhand der bedingten Reaktionen im Training ist gut zu erkennen, dass die Zuordnung der Tiere in ihre Behandlungsgruppen sehr homogen erfolgte, wie es für den Versuch auch erforderlich war. Signifikante Unterschiede bestanden zwischen den bedingten Reaktionen im Training erwartungsgemäß nicht. Im Relearning war nun wichtig, ob Unterschiede in den Gruppen nachweisbar waren. Wir konnten feststellen, dass sowohl die Tiere der Kontrollgruppe als auch die Tiere, die mit 2,5 und 5 mg/kg KG Morphin behandelt worden waren, deutlich mehr bedingte Reaktionen im Relearning als im Training zeigten, was die Gedächtnisleistung widerspiegelte. Dieser Effekt blieb bei den mit 10 mg/kg KG behandelten Tieren aus. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der bedingten Reaktionen im Relearning dieser Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Weiterhin war kein Unterschied der Retentionsindizes der Kontrollgruppe und der mit 2,5 und 5 mg/kg KG behandelten Morphingruppen nachweisbar. Der Retentionsindex der mit 10 mg/kg KG behandelten Morphingruppe war

dagegen signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse hinsichtlich der bedingten Reaktionen sowie der Retentionsindizes belegen demnach einen deutlichen retentionshemmenden Effekt der höchsten Morphindosis an der Shuttle-Box.

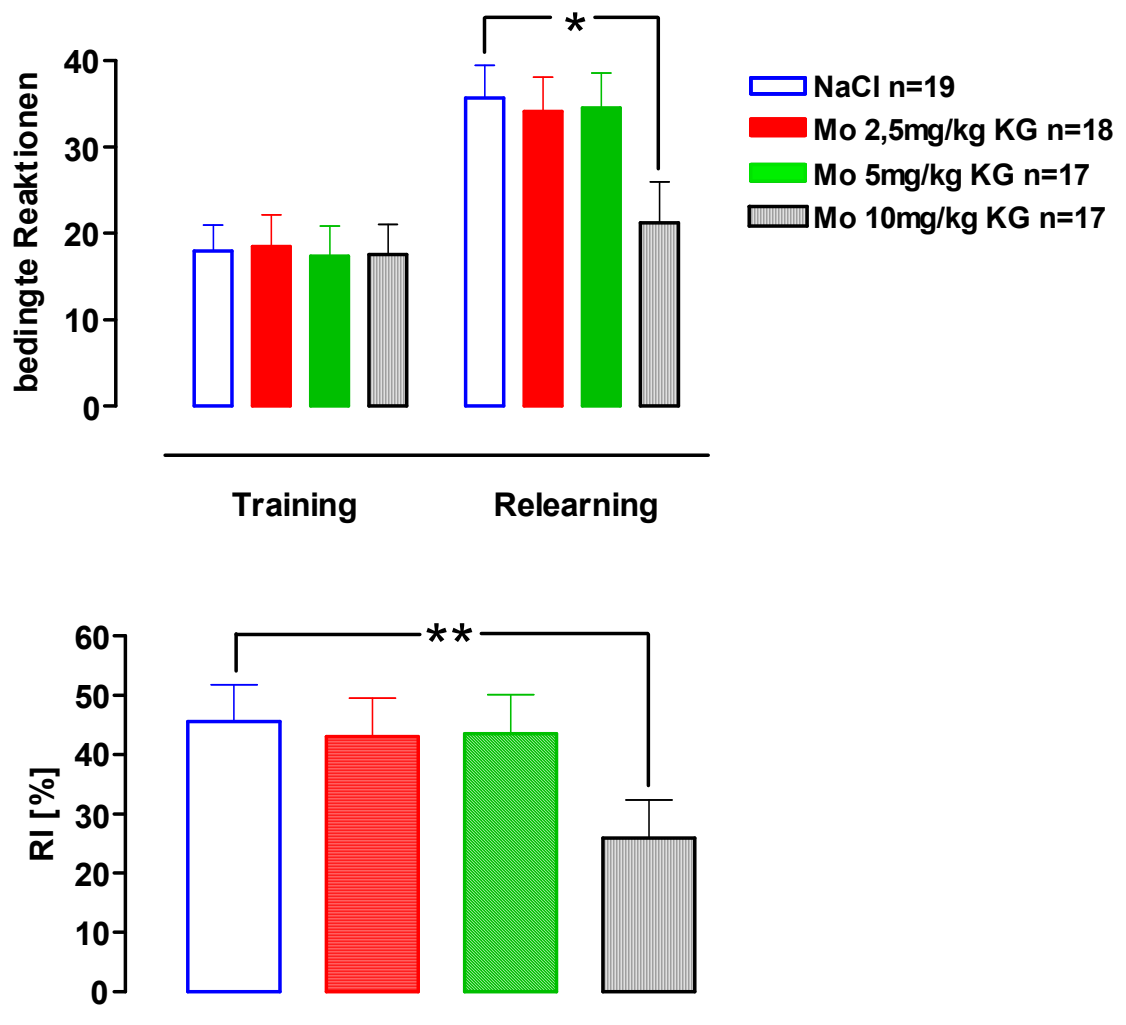


Abb. 4: akuter Morphineffekt auf bedingte Reaktionen und Retentionsindex naiver Tiere in der **Shuttle-Box** ($X \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY, * $p=0,030$ ** $p=0,023$)

Entsprechend der Versuche an der Shuttle-Box wurden auch an der Y-Kammer die Tiere nach dem Training den Behandlungsgruppen zugeordnet, um eine homogene Verteilung der gemessenen Parameter (hier: Trainingsfehler) über die Gruppen sicherzustellen. 27 naive Tiere standen für den Versuch zur Verfügung. Insgesamt mussten 31 Läufe und 10 Wechsel absolviert werden. Die Einordnung erfolgte wie bei der Shuttle-Box in vier Gruppen. Entsprechend

ihrer Zuordnung wurden die Tiere sofort nach dem Training mit Kochsalz oder Morphin in drei Dosierungen behandelt (2,5 mg/kg KG, 5 mg/kg KG oder 10 mg/kg KG). Nach 24 Stunden erfolgte das Relearning. Es wurden sowohl die Fehler als auch die Retentionsindizes ausgewertet. Zusätzlich wurden die Zunahmen richtiger Wechsel analysiert. Die Ergebnisse sind graphisch in den Abbildungen 5 und 6 dargestellt.

Die Trainingsfehler verdeutlichen, dass die Verteilung der Tiere in die unterschiedlichen Behandlungsgruppen homogen erfolgt war. Im Relearning zeigten sich nun erwartungsgemäß weniger Fehler in der Hell-Dunkel-Diskriminierung, allerdings unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant voneinander. Selbst die hohe Morphindosis hatte keinen negativen Einfluss auf die gemessenen Parameter.

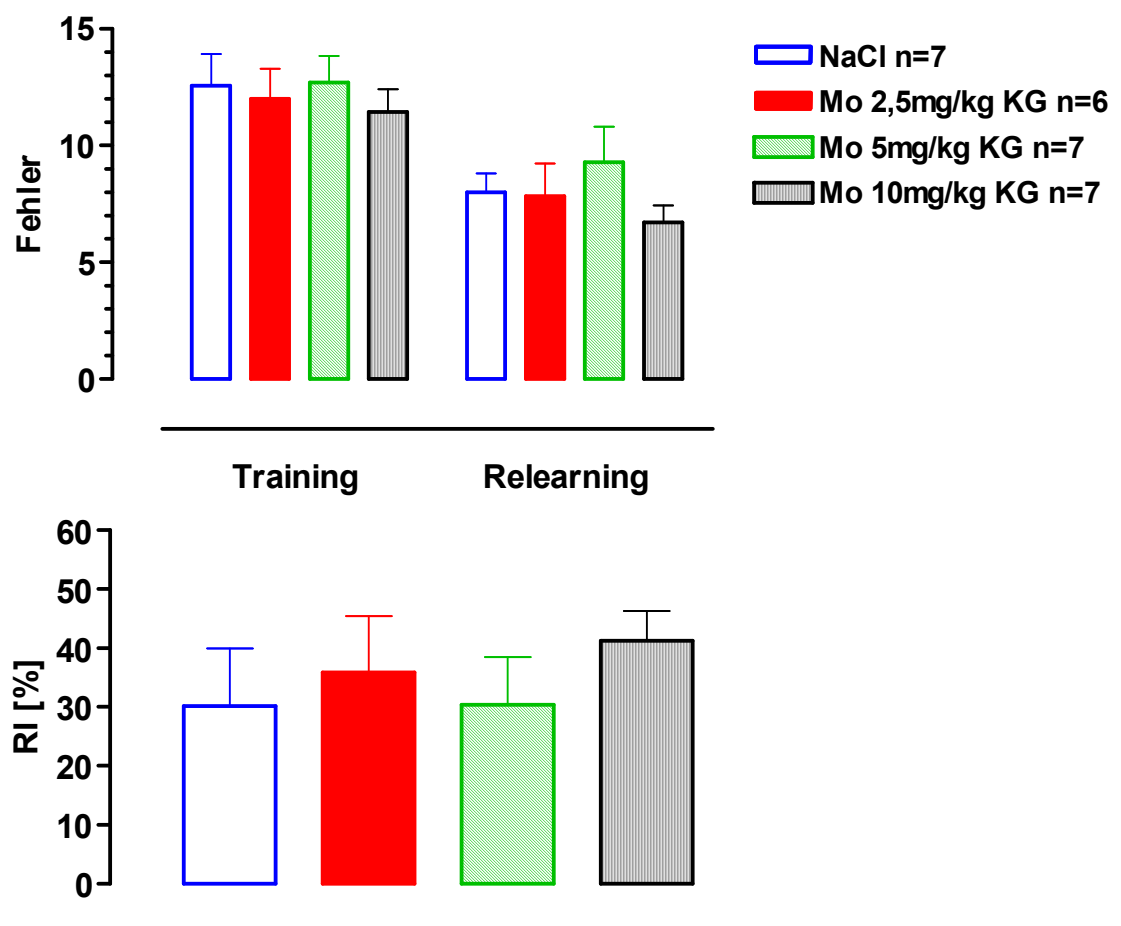


Abb. 5: akuter Morphineffekt auf Fehler und Retentionsindex naiver Tiere in der **Y-Kammer**

($X \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY)

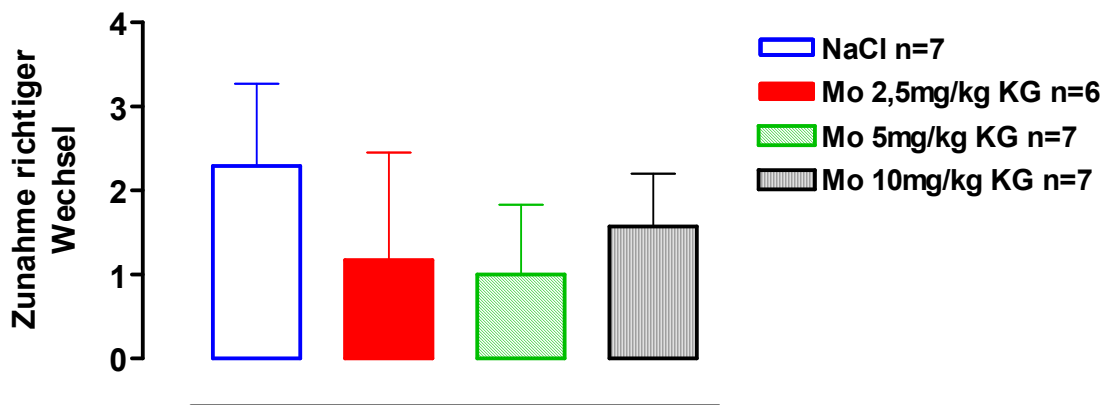


Abb. 6: akuter Morphineffekt auf die Zunahme richtiger Wechsel naiver Tiere in der **Y-Kammer**
($\bar{X} \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY)

Weiterhin bestand auch zwischen den Retentionsindizes der mit Morphin behandelten Gruppen und der Kontrollgruppe kein Unterschied. Auch die Zunahmen richtiger Wechsel unterschieden sich nicht. Der negative Einfluss auf die bedingten Reaktionen sowie die Retention unter der hohen Morphindosis, wie sie in der Shuttle-Box beobachtet wurden, ließ sich somit in der Y-Kammer nicht nachweisen.

Demnach beeinflusste nur in der Shuttle-Box die höchste Morphindosis von 10 mg/kg KG bei naiven Tieren die Gedächtnisleistung. Auf die Retention in der Y-Kammer hatte keine der Morphindosen eine Wirkung.

3.1.2. Etonitazen und naive Tiere

Für die Lernversuche an der Shuttle-Box standen 55 naive Tiere zur Verfügung. Genau wie bei der Morphinbehandlung wurden auch hier die Trainingsleistungen ausgewertet und danach die Einordnung der Tiere in die verschiedenen Behandlungsgruppen vorgenommen. Da bei den mit Morphin behandelten Tieren an der Shuttle-Box lediglich in der höchsten Dosis ein retentionshemmender Effekt nachweisbar war, wurde bei den äquianalgetischen Etonitazendosen von vornherein auf die geringste Dosis von 2,5 µg/kg KG verzichtet, sodass neben Kochsalz nur 5 und 10 µg/kg KG getestet wurden. Unmittelbar nach dem Training wurden die Tiere entsprechend ihrer Zuordnung mit Kochsalz oder Etonitazen behandelt. Nach 24 Stunden erfolgte das Relearning. Sowohl die bedingten Reaktionen als auch die

Retentionsindizes wurden ausgewertet. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 7 dargestellt.

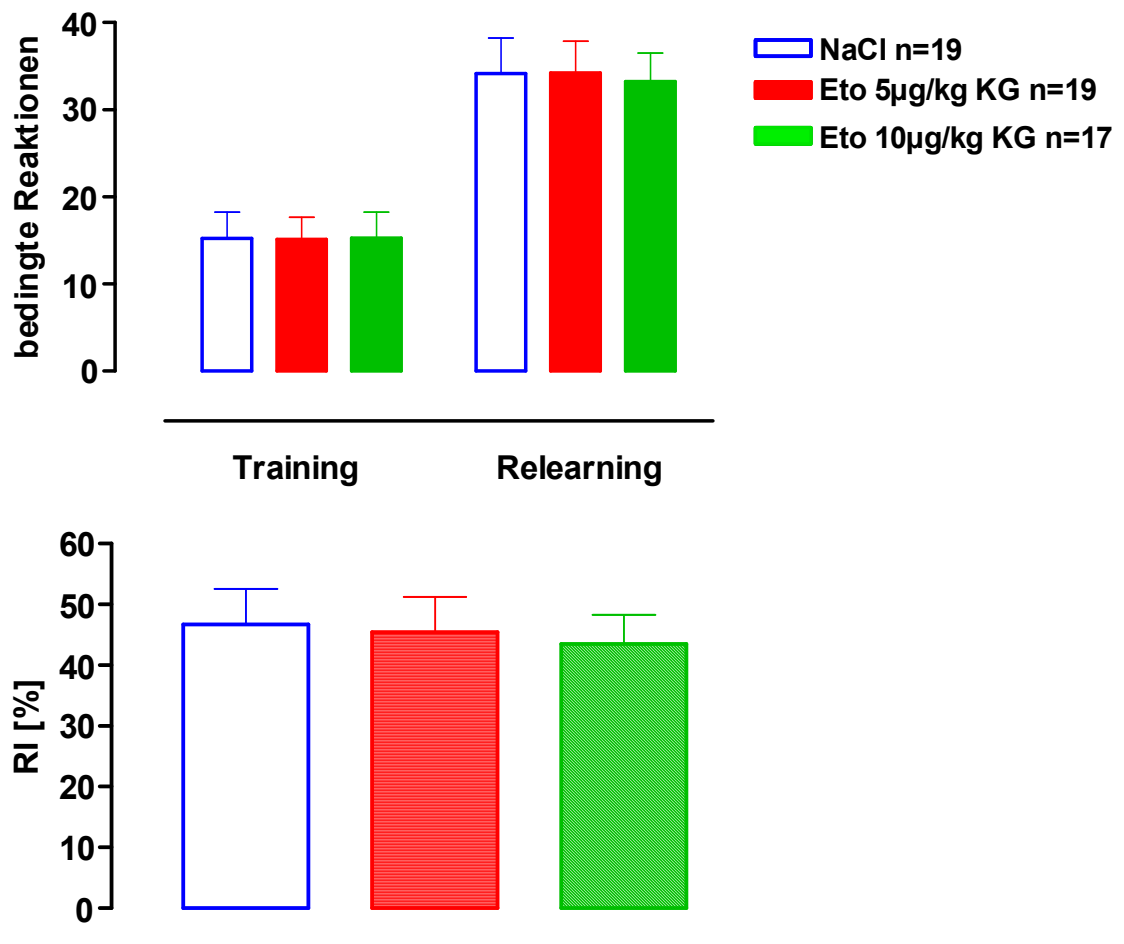


Abb. 7: akuter Etonitazeneffekt auf bedingte Reaktionen und Retentionsindex naiver Tiere in der **Shuttle-Box** ($X \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY)

Die bedingten Reaktionen im Training waren in allen Behandlungsgruppen vergleichbar. Signifikante Unterschiede gab es nicht. Im Relearning zeigten sich nun in allen drei Gruppen deutlich mehr bedingte Reaktionen als im Training. Untereinander unterschieden sich die einzelnen Gruppen jedoch nicht. Dies stellte sich auch in den Retentionsindizes dar, bei denen ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den mit 5 und 10 µg/kg KG Etonitazen behandelten Gruppen nachweisbar war. Keine der getesteten Etonitazendosierungen hatten demnach einen Einfluss auf die Retention in der Shuttle-Box.

Für die Lernversuche an der Y-Kammer wurden 22 naive Tiere verwendet. Da bei den akut mit Morphin behandelten Tieren an der Y-Kammer in keiner Dosis ein retentionshemmender Effekt nachweisbar war, wurde Etonitazen von vornherein nur in der höchsten äquianalgetischen Dosis von 10 µg/kg KG eingesetzt. Wieder erfolgte die Aufteilung der Tiere in die Behandlungsgruppen nach ihren Trainingsleistungen. Sofort nach dem Training wurden die Tiere entsprechend ihrer Zuordnung mit Kochsalz oder Etonitazen behandelt. Nach 24 Stunden erfolgte das Relearning. Es wurden sowohl die Fehler als auch die Retentionsindizes ausgewertet und die Zunahmen richtiger Wechsel analysiert. Die Ergebnisse sind graphisch in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt.

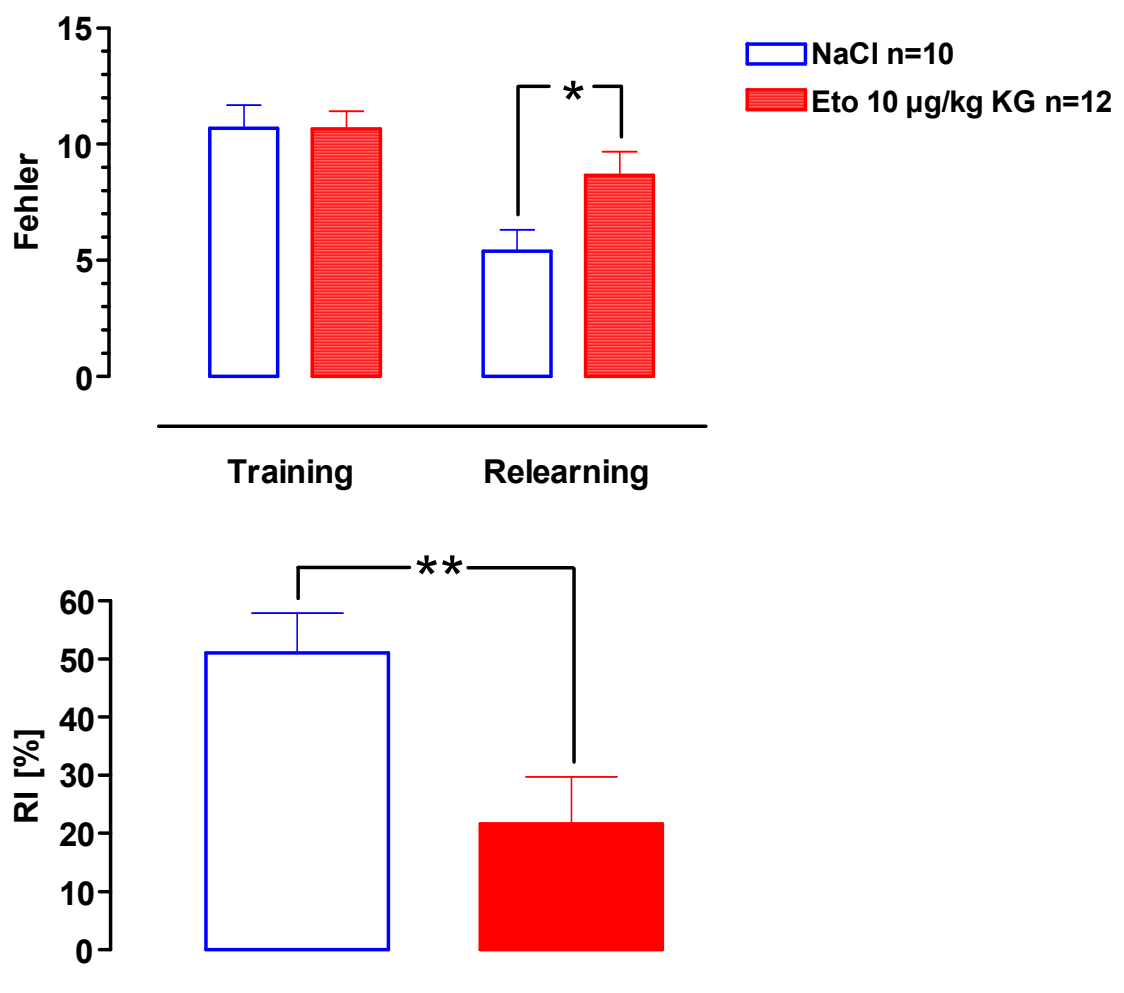


Abb. 8: akuter Etonitazeneffekt auf Fehler und Retentionsindex naiver Tiere in der **Y-Kammer**

(X ± SEM, U-Test nach MANN-WHITNEY, *p=0,021 **p=0,007)

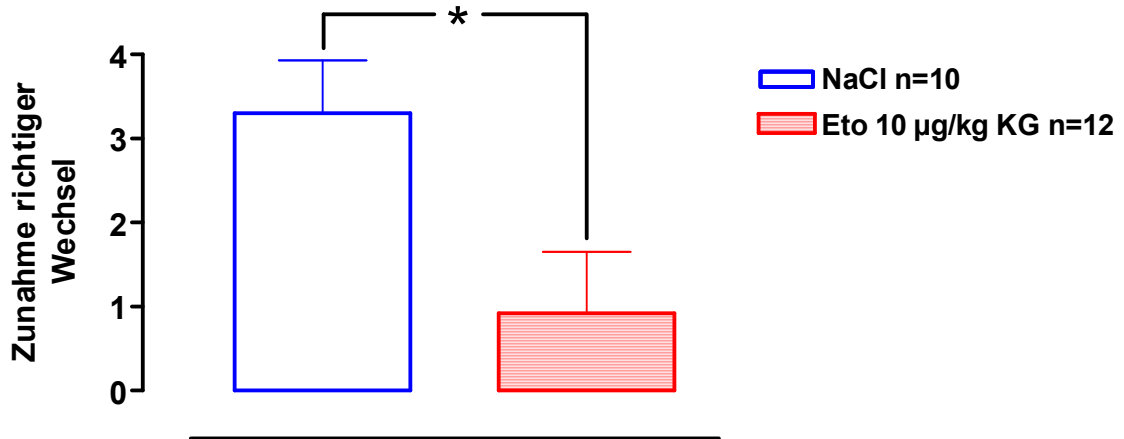


Abb. 9: akuter Etonitazeneffekt auf die Zunahme richtiger Wechsel naiver Tiere in der **Y-Kammer**
($X \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY, $*p=0,025$)

Die fehlenden Unterschiede in den Trainingsfehlern demonstrieren, dass die Zuordnung in die Behandlungsgruppen korrekt erfolgt war. Im Relearning zeigte sich, dass die Tiere der Kontrollgruppe deutlich weniger Fehler machten als im Training. Zwar traten auch in der Etonitazengruppe weniger Fehler auf, aber signifikant mehr als in der Kontrollgruppe. Dies spiegelte sich auch in einem deutlich niedrigeren Retentionsindex in der Etonitazengruppe wider. Darüber hinaus war die Zunahme richtiger Wechsel bei den mit Etonitazen behandelten Tieren signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe.

Es zeigte sich also an der Shuttle-Box kein retentionshemmender Effekt von Etonitazen, während an der Y-Kammer ein deutlich negativer Effekt auf das Gedächtnis messbar war. Dementsprechend sind die akuten Einflüsse von Etonitazen auf die Retention in Shuttle-Box und Y-Kammer genau entgegengesetzt zu den beobachteten akuten Morphineffekten in den beiden Lernmodellen.

3.1.3. Naloxon (prä-Training) und naive Tiere

Für die Lernversuche mit vor dem Training appliziertem Naloxon (prä-Training) wurden die Tiere im Gegensatz zu den Versuchen, bei denen Substanzen nach dem Training (post-Training) gegeben wurden, durch eine Randomisierung den einzelnen Behandlungsgruppen zugeteilt. So war es möglich, Effekte von Naloxon auf die Trainingsleistung festzustellen und zusätzlich im Relearning

nach 24 Stunden zu überprüfen. Es wurde also nicht nur getestet, ob Naloxon Wirkungen auf die Retention hat (Analyse der Messwerte im Relearning), sondern ob das Lernen während des Trainings beeinflusst werden kann. Daher wurden 56 naive Tiere in drei Gruppen randomisiert (1 Kontrollgruppe + 2 Naloxongruppen). Unmittelbar vor dem Training wurden die Tiere mit Kochsalz oder Naloxon in zwei Dosierungen behandelt (1 mg/kg KG oder 10 mg/kg KG). Nach 24 Stunden erfolgte das Relearning. Es kamen die bedingten Reaktionen und die Retentionsindizes zur Auswertung. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 10 dargestellt.

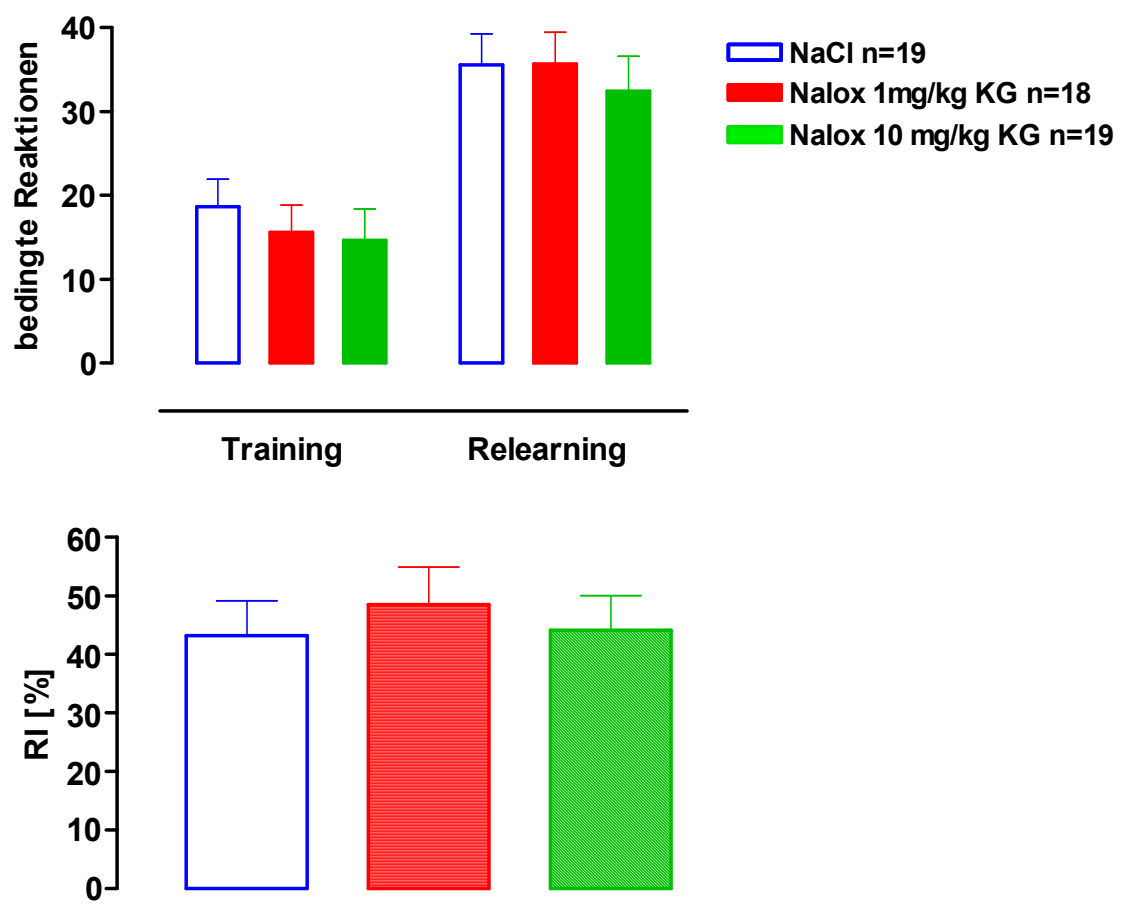


Abb. 10: akuter Naloxoneffekt (prä-Training) auf bedingte Reaktionen und Retentionsindex naiver Tiere in der **Shuttle-Box** ($X \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY)

Die Ergebnisse demonstrieren, dass im Training die Tiere aller Gruppen eine vergleichbare Zahl bedingter Reaktionen zeigten. Signifikante Unterschiede gab

es hier zwischen den Behandlungsgruppen nicht, sodass geschlussfolgert werden kann, dass das Erlernen der bedingten Reaktionen ungestört verlief.

Um die Wirkung auf die Retention zu messen, wurden die bedingten Reaktionen des Relearnings verglichen. Hier zeigte sich, dass sowohl die Tiere der Kontrollgruppe als auch Tiere, die mit 1 mg/kg KG bzw. 10 mg/kg KG Naloxon behandelt worden waren, deutlich mehr bedingte Reaktionen im Relearning erreichten als im Training, ohne jedoch Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen im Training oder im Relearning nachweisen zu können. Ähnlich waren die Ergebnisse der Retentionsindizes. Auch hier gab es in allen Gruppen vergleichbare Werte.

Dies belegt, dass sowohl das Lernen als auch die Retention durch vor dem Training appliziertem Naloxon in der Shuttle-Box nicht beeinflusst wurden. Aufgrund der negativen Ergebnisse wurde auf eine prä-Training-Untersuchung an der Y-Kammer verzichtet.

3.1.4. Naloxon (post-Training) und naive Tiere

Um Naloxoneffekte nach post-Training-Applikation zu untersuchen, wurden Tiere, wie schon zuvor bei Morphin und Etonitazen beschrieben, in einem Training an der Shuttle-Box getestet und entsprechend ihrer Trainingsleistung drei Gruppen zugeteilt. 46 naive Tiere standen zur Verfügung. Sofort nach dem Training wurden die Tiere entsprechend ihrer Zuordnung mit Kochsalz oder Naloxon in zwei Dosierungen behandelt (1 mg/kg KG oder 10 mg/kg KG). Nach 24 Stunden erfolgte das Relearning. Es wurden sowohl die bedingten Reaktionen als auch die Retentionsindizes ausgewertet. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 11 dargestellt.

Die bedingten Reaktionen im Training waren zwischen den Gruppen vergleichbar, auch wenn in der Grafik der Eindruck entstehen könnte, dass dies nicht so ist. Signifikante Unterschiede gab es nicht. Somit konnte die wichtige gleichmäßige Verteilung der Gruppen im Training bestätigt werden. Im Relearning zeigten sowohl die Tiere der Kontrollgruppe als auch Tiere, die mit 1 mg/kg KG Naloxon behandelt wurden, deutlich mehr bedingte Reaktionen als im Training. Dieser Effekt schien bei den mit 10 mg/kg KG behandelten Tieren abgeschwächt zu sein. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied der

bedingten Reaktionen im Relearning zwischen den Gruppen nachgewiesen werden.

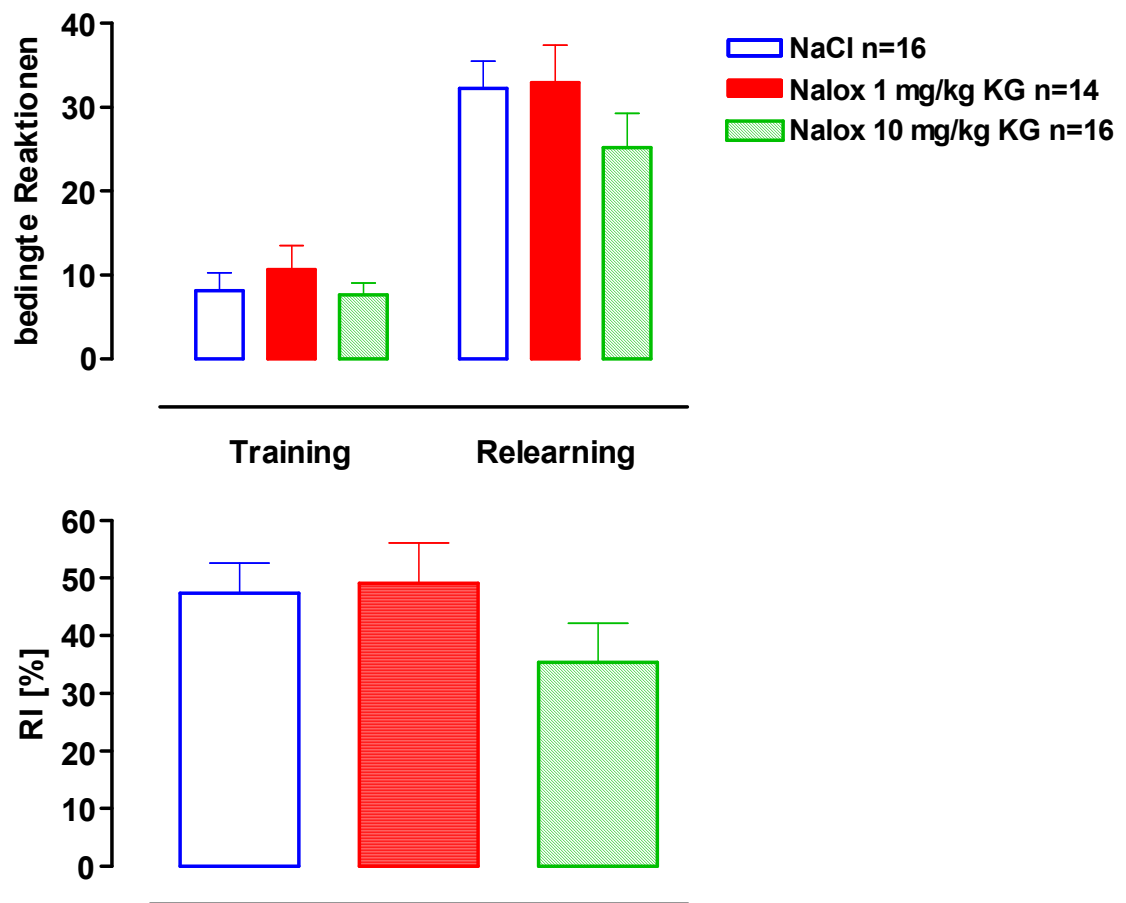


Abb. 11: akuter Naloxoneffekt (post-Training) auf bedingte Reaktionen und Retentionsindex naiver Tiere in der **Shuttle-Box** ($X \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY)

Vergleichbar waren die Ergebnisse der Retentionsindizes. Während in der Kontrollgruppe und den mit 1 mg/kg KG Naloxon behandelten Tieren kein Unterschied feststellbar war, zeigte sich in der Gruppe mit der hohen Naloxondosis eher eine Tendenz zur Retentionsverschlechterung, allerdings ohne Signifikanz.

Dies zeigt, dass die Gedächtnisleistung in der Shuttle-Box durch Naloxon weder in der geringen noch in der hohen Dosis beeinflusst wird. Dies gilt sowohl für Tiere, die Naloxon vor als auch nach dem Training erhalten hatten.

Aus diesem Grunde erfolgten die Lernversuche an der Y-Kammer von vornherein nur mit nach dem Training appliziertem Naloxon, wie es für diese

Substanz auch überwiegend in der Literatur beschrieben ist. Dafür wurden 27 naive Tiere im Training getestet und der Behandlungs- und Kontrollgruppe zugeteilt. Weiterhin kam bei Naloxon lediglich eine Dosis von 10 mg/kg KG zum Einsatz, was aus den Ergebnissen an der Shuttle-Box abgeleitet wurde. Unmittelbar nach dem Training wurden die Tiere dann entsprechend ihrer Zuordnung mit Kochsalz oder Naloxon behandelt. Nach 24 Stunden erfolgte das Relearning. Es wurden die Fehler und die Retentionsindizes ausgewertet. Weiterhin wurden die Zunahmen richtiger Wechsel analysiert. Die Ergebnisse sind graphisch in den Abbildungen 12 und 13 dargestellt.

Auch hier zeigte sich eine ausgeglichene Anzahl an Trainingsfehlern in beiden Behandlungsgruppen ohne signifikante Unterschiede. Es zeigte sich darüber hinaus, dass die Tiere beider Gruppen im Relearning deutlich weniger Fehler machten. Unterschiede zwischen beiden Gruppen gab es aber nicht.

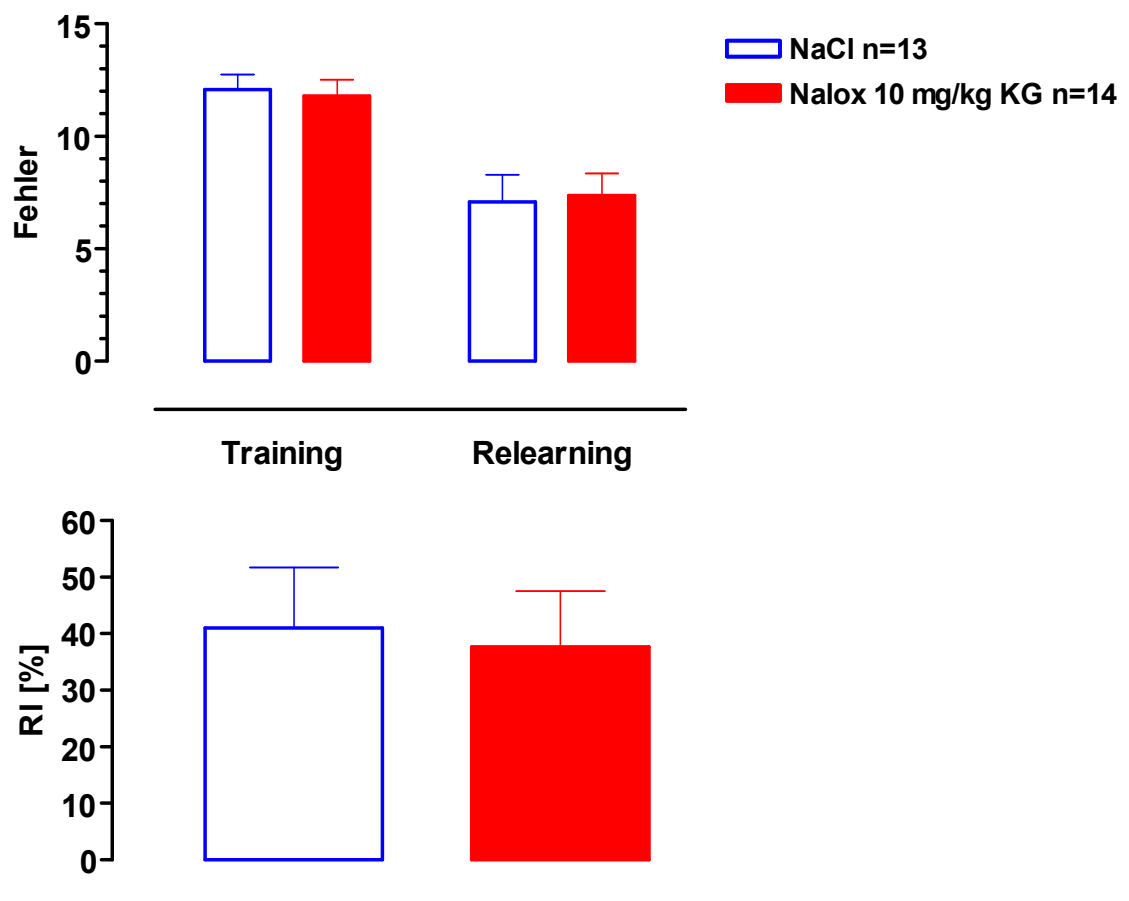


Abb. 12: akuter Naloxoneffekt auf Fehler und Retentionsindex naiver Tiere in der **Y-Kammer**
($\bar{X} \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY)

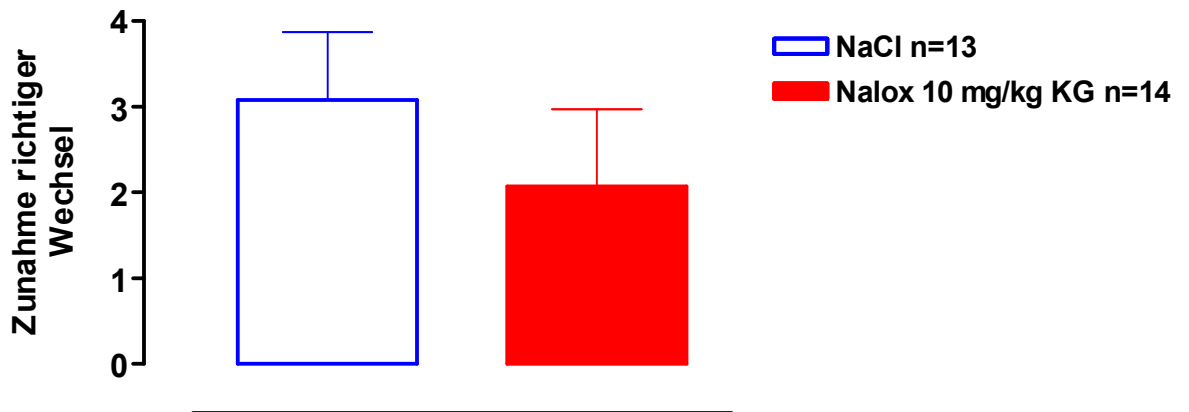


Abb. 13: akuter Naloxoneffekt auf die Zunahme richtiger Wechsel naiver Tiere in der **Y-Kammer**
($X \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY)

Dies spiegelte sich auch im Retentionsindex wider, der sich ebenfalls in beiden Gruppen nicht unterschied. Es schienen allerdings die mit Naloxon behandelten Tiere eine zumindest numerisch geringere Zunahme richtiger Wechsel zu zeigen, ohne Signifikanz zu erreichen.

Die Ergebnisse belegen daher sehr deutlich, dass die akute Behandlung mit Naloxon bei naiven Tieren weder in der Shuttle-Box noch in der Y-Kammer einen nachweisbaren Einfluss auf die Retention hatte.

3.2. Vorbehandelte Tiere

3.2.1. Morphin-vorbehandelte Tiere

3.2.1.1. Kurzzeit-Intervall: 4 - 5 Wochen nach Ende der Vorbehandlung

Für die chronische Vorbehandlung mit Opioiden wurden naive Tiere in zwei Gruppen randomisiert (NaCl-vorbehandelt und Morphin-vorbehandelt) und vier Wochen lang entsprechend ihrer Zuordnung mit täglichen Injektionen (Pausen an den Wochenenden) von Kochsalz oder 10 mg/kg KG Morphin vorbehandelt. In einem Käfig wurden immer Tiere mit der gleichen Vorbehandlung gehalten. Nach 4-5 Wochen Abstinenz erfolgten dann die Versuche. Aus jeder Gruppe wurden Tiere entweder in der Shuttle-Box oder in der Y-Kammer in einem Lernversuch getestet. Die erste Frage war, ob sich die mit Morphin vorbehandelten Tiere von den Kochsalzkontrollen unterschieden. Nach dem Training wurden die unterschiedlich vorbehandelten Tiere wieder entsprechend ihrer Trainingsleistung den akuten Behandlungsgruppen zugeteilt.

Für die Shuttle-Box-Versuche erhielten die Tiere beider vorbehandelter Gruppen sofort nach dem Training entsprechend ihrer Zuordnung entweder Kochsalz oder 10 mg/kg KG Morphin. Nach 24 Stunden erfolgte das Relearning. Es wurden die bedingten Reaktionen und die Retentionsindizes ausgewertet. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 14 dargestellt.

Die Trainingsergebnisse zeigen, dass es hinsichtlich der bedingten Reaktionen zwischen den beiden chronisch vorbehandelten Gruppen keine Unterschiede gab, was bedeutet, dass chronisch appliziertes Morphin nach vier Wochen Abstinenz keinen Einfluss auf die Leistungen der Tiere im Training hatte. Darüber hinaus war die Aufteilung der Tiere in die akut zu behandelnden Untergruppen gleichmäßig erfolgt.

Im Relearning zeigten alle Tiere mehr bedingte Reaktionen als im Training. Allerdings traten in der chronisch mit Morphin vorbehandelten Gruppe signifikant weniger bedingte Reaktionen bei den Tieren auf, die nach dem Training akut Morphin erhalten hatten im Vergleich mit der entsprechenden Kontrollgruppe.

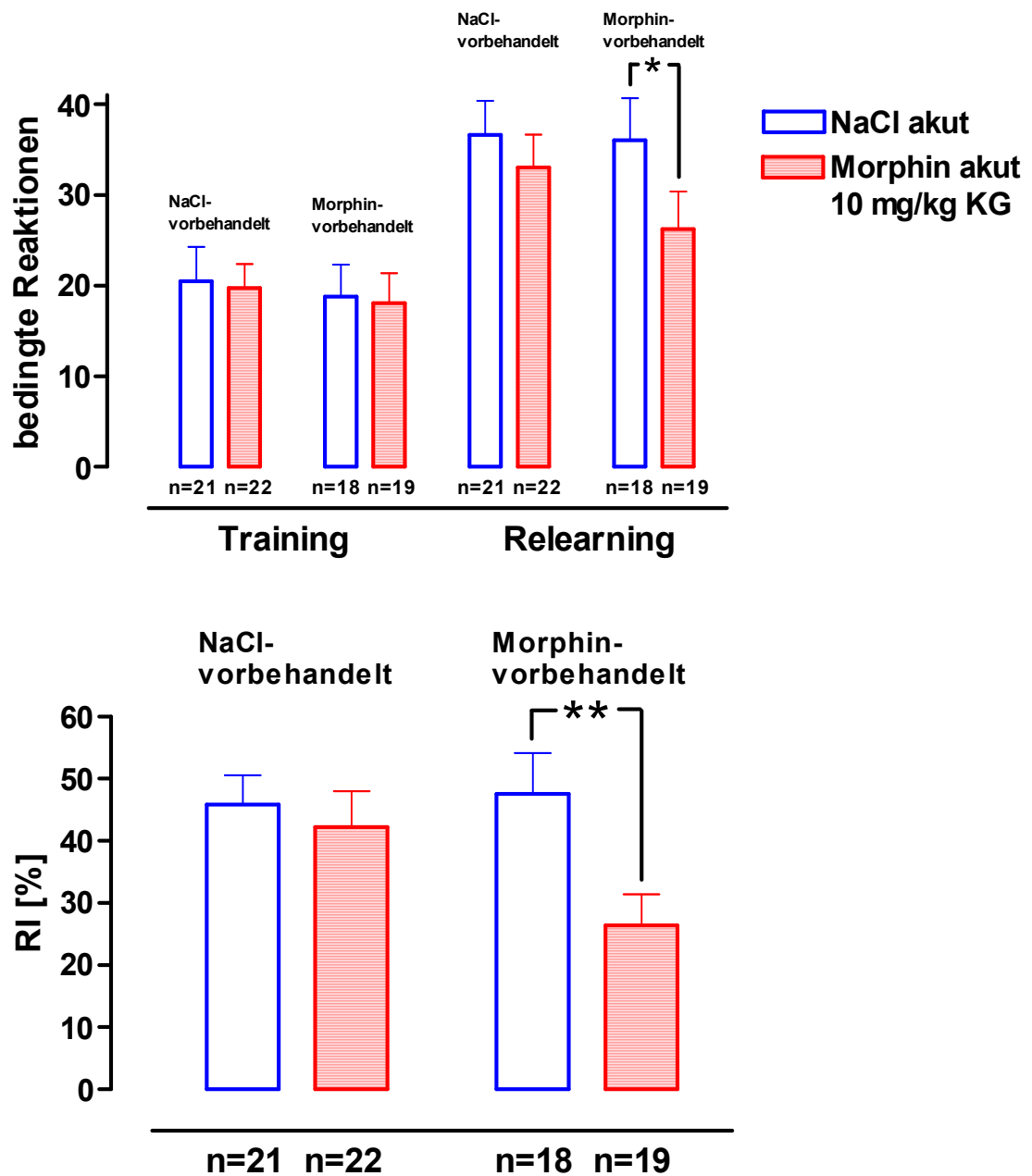


Abb. 14: akuter Morphineffekt auf bedingte Reaktionen und Retentionsindex vorbehandelter Tiere in der Shuttle-Box (5 Wochen nach Ende der Vorbehandlung)
($\bar{X} \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY, * $p=0,039$ ** $p=0,012$)

Ähnliches ließ sich bei den Retentionsindizes darstellen. Allerdings zeigte sich, dass die Gruppe, die während der chronischen Vorbehandlung Kochsalz erhalten hatte, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Retentionsindizes der Untergruppen (NaCl und Morphin) aufwies. Anders verhielt es sich mit der Gruppe, die während der chronischen Vorbehandlung Morphin erhalten hatte. Hier war zwischen den Untergruppen ein signifikanter

Unterschied feststellbar. Die akut mit Morphin behandelten Tiere hatten demnach einen deutlich geringeren Retentionsindex als die Kontrolltiere.

Folglich beeinflusste akut nach dem Training appliziertes Morphin die Retention in der Shuttle-Box bei den chronisch mit Morphin vorbehandelten Tieren. Chronisch mit Kochsalz vorbehandelte Tiere wurden durch akut nach dem Training verabreichtes Morphin dagegen nicht signifikant in ihrer Gedächtnisleistung beeinflusst.

Vergleichbare Effekte zeigten sich auch an der Y-Kammer. Hierzu wurden vorbehandelte Tiere in einem Training getestet und genau wie bei der Shuttle-Box in akut zu behandelnde Untergruppen aufgeteilt. Sofort nach dem Training erhielten die Tiere beider vorbehandelter Gruppen entsprechend ihrer Zuordnung entweder Kochsalz oder 10 mg/kg KG Morphin. Nach 24 Stunden erfolgte das Relearning. Es wurden neben den Fehlern und Retentionsindizes auch die Zunahmen richtiger Wechsel analysiert. Die Ergebnisse sind graphisch in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt.

Die Auswertung der Trainingsfehler der vorbehandelten Gruppen ließ einen Trend zu einer schlechteren Leistung der chronischen Morphingruppe im Vergleich mit der chronischen Kontrollgruppe erkennen. Dieser Unterschied verfehlte jedoch knapp das Signifikanzniveau ($p=0,057$). Die Verteilung der Tiere in die akuten Untergruppen war gleichmäßig, auch wenn in der grafischen Auswertung der Morphin-vorbehandelten Gruppe im Training der Eindruck entsteht, dass dies nicht der Fall war.

Im Relearning machten sowohl die Tiere der mit Kochsalz vorbehandelten Gruppe als auch die Tiere der mit Morphin vorbehandelten Gruppe tendenziell weniger Fehler als im Training. Unterschiede zwischen den einzelnen Untergruppen (NaCl akut und Morphin akut) ließen sich statistisch aber nicht sichern.

Deutlicher war der Effekt bei den Retentionsindizes. Hier zeigte sich, dass die Gruppe, die während der chronischen Vorbehandlung Kochsalz erhalten hatte, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Retentionsindizes der Untergruppen (NaCl und Morphin) aufwies. Die Unterschiede in der Zunahme richtiger Wechsel waren ebenfalls nicht signifikant. Die Gruppe, die während der chronischen Vorbehandlung Morphin erhalten hatte, zeigte in den Untergruppen allerdings signifikante Unterschiede. Die akut mit Morphin

behandelten Tiere hatten einen deutlich geringeren Retentionsindex und eine sehr deutliche Reduktion der Zunahme richtiger Wechsel im Vergleich mit den Kontrolltieren.

Demnach störte akut nach dem Training appliziertes Morphin die Retention in der Y-Kammer lediglich bei den chronisch mit Morphin vorbehandelten Tieren. Chronisch mit Kochsalz vorbehandelte Tiere wurden durch akut nach dem Training verabreichtes Morphin auch an der Y-Kammer nicht beeinflusst.

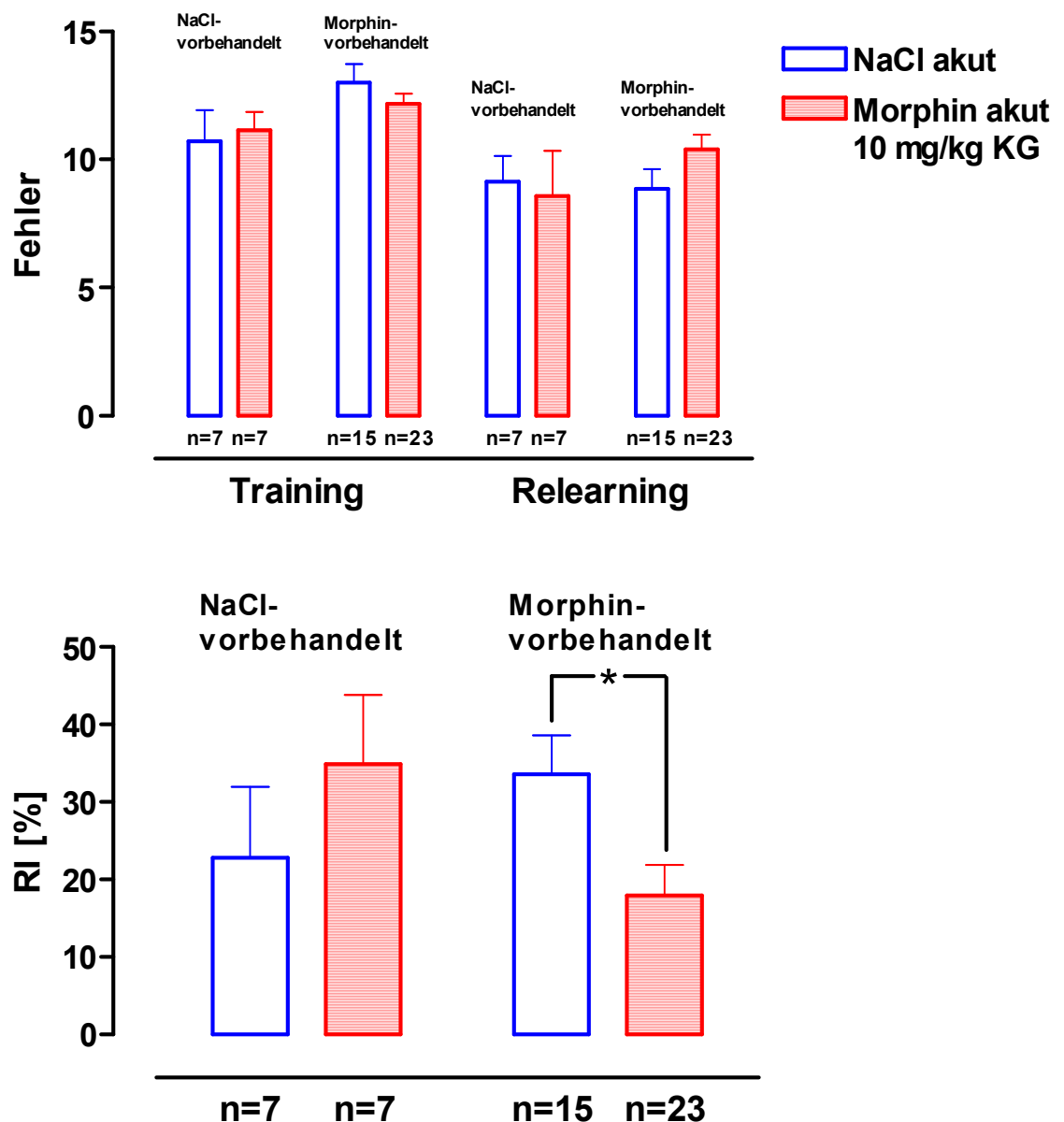


Abb. 15: akuter Morphineffekt auf Fehler und Retentionsindex vorbehandelter Tiere in der **Y-Kammer**
(4 Wochen nach Ende der Vorbehandlung)
($\bar{X} \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY, * $p=0,017$)

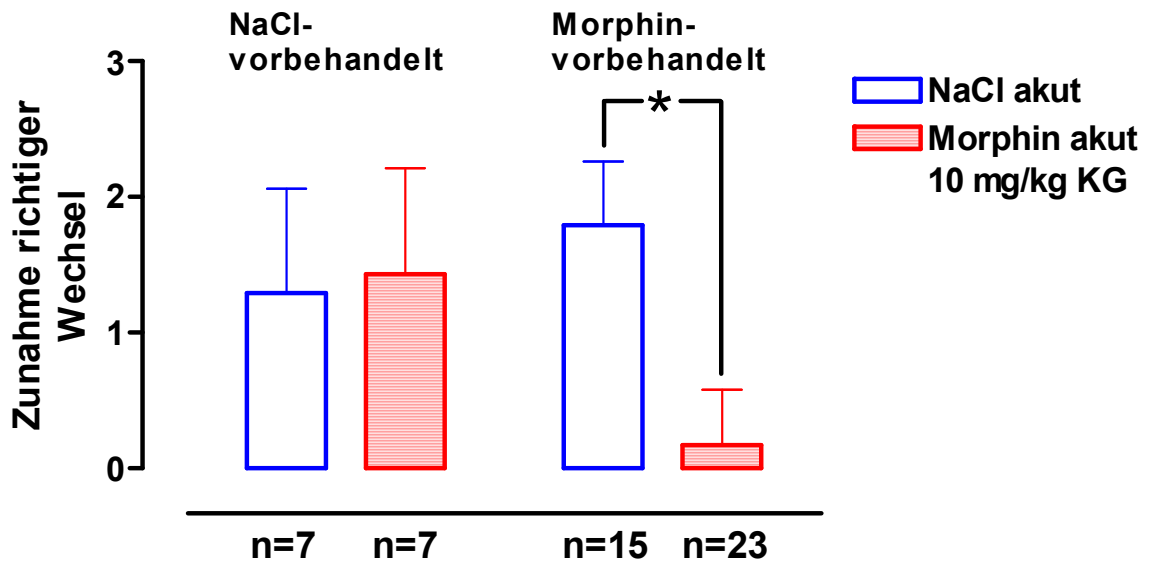


Abb. 16: akuter Morphineffekt auf die Zunahme richtiger Wechsel vorbehandelter Tiere in der **Y-Kammer**
 (4 Wochen nach Ende der Vorbehandlung)
 ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY, $*p=0,017$)

Zusätzlich ergaben sich Hinweise, dass nach einer Abstinenzperiode von vier Wochen die chronische Morphinvorbehandlung selbst bereits im Training zu einer verringerten Leistung führte.

Um Veränderungen des Lernens und des Gedächtnisses durch chronische Morphineffekte im Zusammenhang mit möglichen Veränderungen der Aktivität diskutieren zu können, wurden Tiere zusätzlich in einer Motilitätsmesskammer getestet. Wie bereits beschrieben, wurden naive Tiere in zwei Gruppen randomisiert und entsprechend ihrer Zuordnung chronisch mit Kochsalz oder Morphin vorbehandelt. Nach 5 Wochen Abstinenz wurden die Versuche durchgeführt. Während der Habituation wurde die Aktivität ohne akuten Substanzeeinfluss registriert. Im eigentlichen Test hatten dann alle Tiere beider chronisch vorbehandelter Gruppen 10 mg/kg KG Morphin vor Testbeginn erhalten. Es wurden die Gesamtaktivitäten über 15 min erfasst. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 17 und 18 dargestellt.

Die Gesamtaktivitäten der beiden vorbehandelten Gruppen unterschieden sich nicht während der Habituation, was bedeutet, dass die chronische Vorbehandlung keinen nachweisbaren Einfluss auf die Grundaktivität hatte.

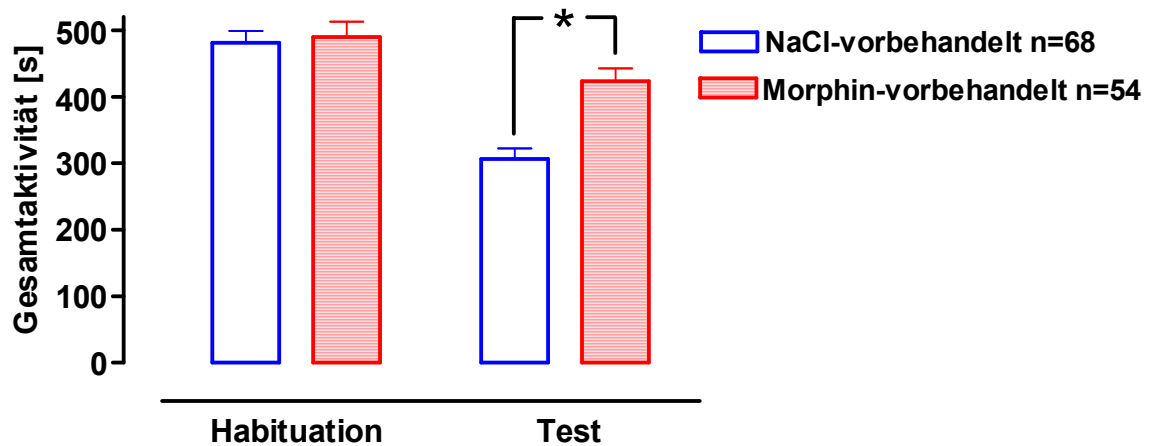


Abb. 17: akuter Morphineffekt (10 mg/kg KG Morphin im Test für beide Gruppen) auf die Gesamtaktivität vorbehandelter Tiere im **MOTI®-System** (5 Wochen nach Ende der Vorbehandlung)
($\bar{X} \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY, $*p < 0,0001$)

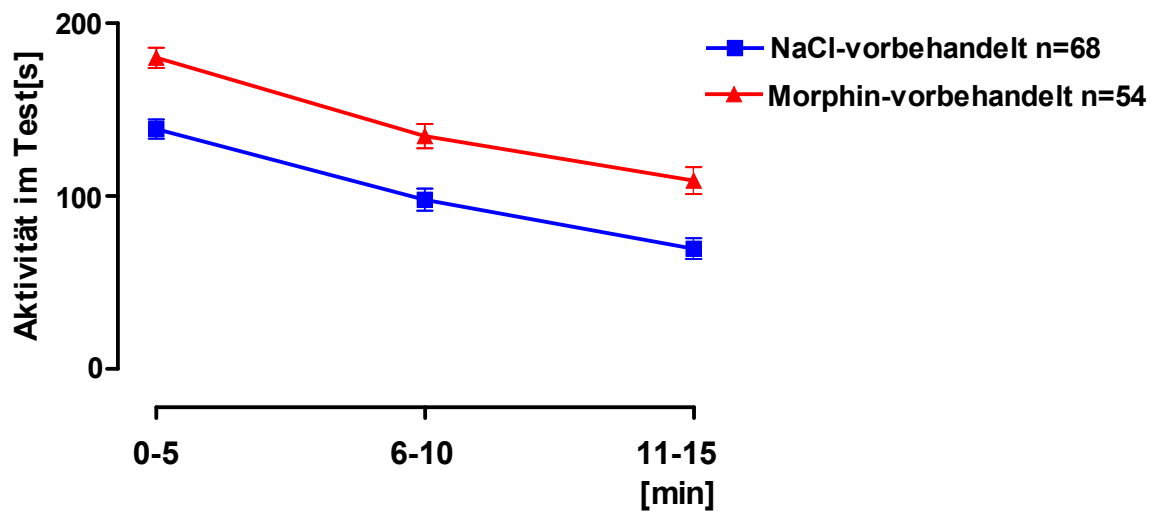


Abb. 18: akuter Morphineffekt (10 mg/kg KG Morphin im Test für beide Gruppen) auf die Aktivität vorbehandelter Tiere im **MOTI®-System** (5 Wochen nach Ende der Vorbehandlung)
($\bar{X} \pm \text{SEM}$, repeated measures ANOVA, $F_{1,120} = 22,276$, $p < 0,0001$)

Anders verhielt es sich nach erneuter Morphinapplikation (Test). Die Gesamtaktivität der chronischen Kochsalzgruppe war signifikant geringer als in der chronisch mit Morphin vorbehandelten Gruppe. Darüber hinaus zeigte sich aber auch in der chronisch vorbehandelten Morphingruppe eine geringere Aktivität im Vergleich mit der Habituation, was jedoch zu erwarten war, da die

Aktivitäten im Test immer niedriger sind, weil die Tiere die Umgebung bereits kennen gelernt haben. Dies zeigt, dass nach einer Abstinenzzeit von 5 Wochen keine Unterschiede in der Gesamtaktivität zu verzeichnen sind, wenn keine weiteren Substanzen zusätzlich akut appliziert werden. Wird allerdings Morphin erneut akut gegeben, so verringert sich nur die Aktivität der chronisch vorbehandelten Kochsalzgruppe deutlich, was ein Ausdruck der akuten sedativen Morphinwirkung ist. Die chronisch mit Morphin vorbehandelten Tiere sind weniger anfällig für diesen Effekt. Dies zeigt, dass noch immer eine Toleranz gegenüber der sedativen Morphinwirkung vorhanden sein muss.

Auch die Auswertung der Aktivitäten in 5-min-Intervallen zeigte im Test den Unterschied zwischen beiden Gruppen, wobei genau wie bei den Gesamtaktivitäten auch die Aktivitäten in jedem Beobachtungsintervall der chronischen Kochsalzgruppe niedriger waren als in der chronischen Morphingruppe. Weiterhin zeigte sich eine Aktivitätsabnahme im Verlauf für beide Gruppen, was Ausdruck der sedativen Morphinwirkung sowie der Gewöhnung an die Umgebung ist.

3.2.1.2. Langzeit-Intervall: 10 - 16 Wochen nach Ende der Vorbehandlung

Genau wie bei der Kurzzeit-Abstinenz wurden naive Tiere in zwei Gruppen randomisiert und entsprechend ihrer Zuordnung über einen Zeitraum von vier Wochen mit Kochsalz oder 10 mg/kg KG Morphin vorbehandelt. Nach 10-16 Wochen Abstinenz erfolgten dann die Versuche. Tiere aus jeder Gruppe wurden entweder in der Shuttle-Box oder in der Y-Kammer in einem Training getestet und entsprechend ihrer Leistungen auf die akuten Untergruppen verteilt. Für die Versuche an der Shuttle-Box erhielten die Tiere beider vorbehandelter Gruppen sofort nach dem Training entsprechend ihrer Zuordnung entweder Kochsalz oder 10 mg/kg KG Morphin. Nach 24 Stunden erfolgte das Relearning. Es wurden sowohl die bedingten Reaktionen als auch die Retentionsindizes ausgewertet. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 19 dargestellt.

Leider standen für diesen Test relativ wenig Tiere zur Verfügung, was sich in den großen Abweichungen der Standardfehler bemerkbar machte.

Die Auswertung der bedingten Reaktionen im Training ergab, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den chronischen Vorbehandlungsgruppen

bestanden. Dies zeigt, dass chronisch appliziertes Morphin nach 10 Wochen genau wie nach 5 Wochen keinen Einfluss auf die Trainingsleistungen in der Shuttle-Box hatte. Die Verteilung der chronischen Tiere in den akuten Untergruppen war homogen.

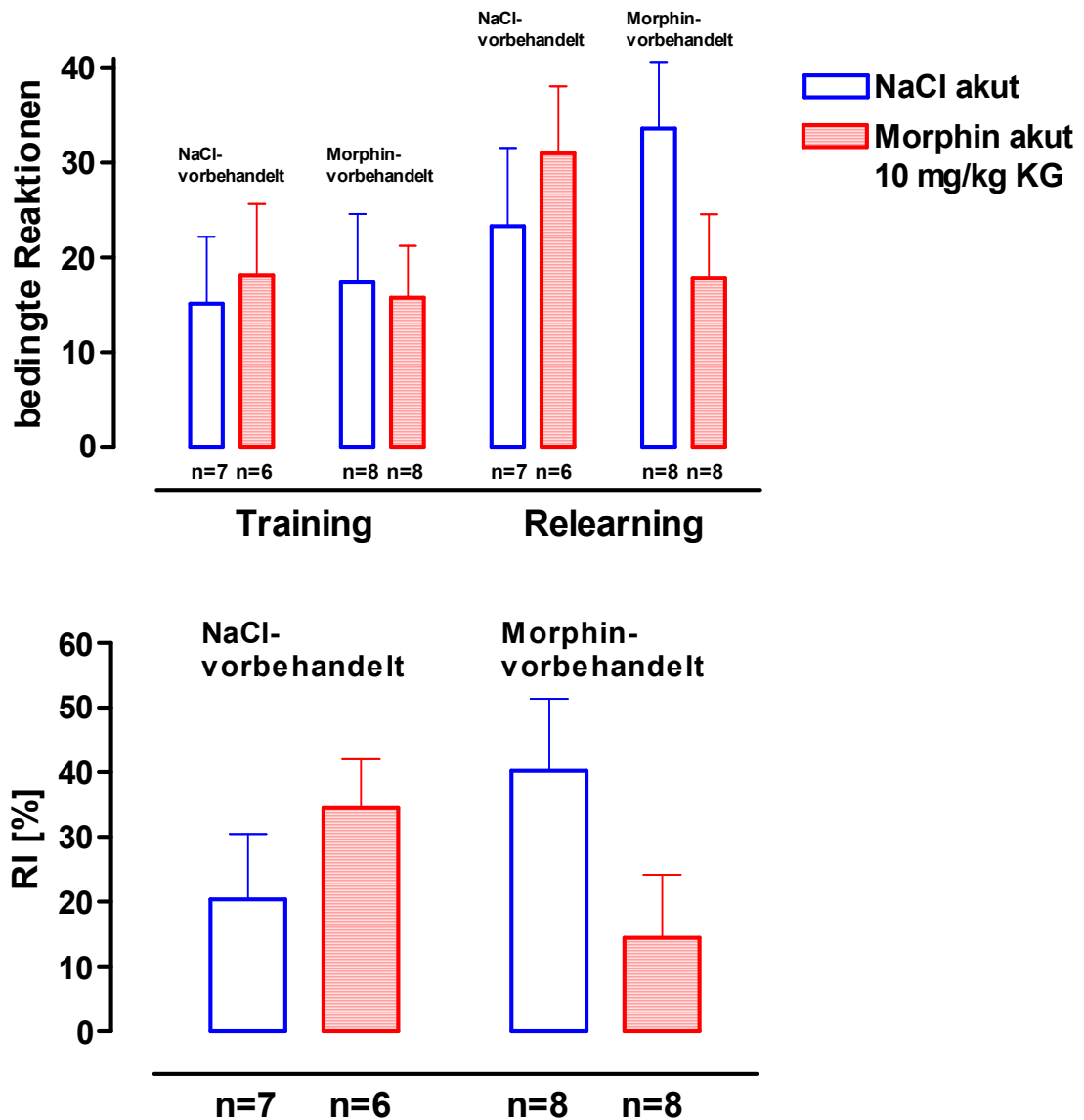


Abb. 19: akuter Morphineffekt auf bedingte Reaktionen und Retentionsindex vorbehandelter Tiere in der Shuttle-Box (10 Wochen nach Ende der Vorbehandlung)
($\bar{X} \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY)

Im Relearning zeigten sowohl die Tiere der mit Kochsalz vorbehandelten Gruppe als auch die Tiere der mit Morphin vorbehandelten Gruppe tendenziell mehr bedingte Reaktionen als im Training. Allerdings schwankten die Werte

insgesamt sehr stark. In der mit Morphin vorbehandelten Gruppe traten numerisch weniger bedingte Reaktionen auf, wenn die Tiere nach dem Training akut Morphin erhalten hatten (im Vergleich mit der entsprechenden Kontrollgruppe).

Darüber hinaus zeigte sich, dass die Gruppe, die während der chronischen Vorbehandlung Kochsalz erhalten hatte, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Retentionsindizes der Untergruppen (NaCl und Morphin) aufwies. In der Gruppe, die chronisch mit Morphin vorbehandelt wurde, war die Tendenz einer Retentionsverschlechterung zu erkennen. Allerdings war der Retentionsindex der akut mit Morphin behandelten Untergruppe lediglich numerisch kleiner im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Somit ließ sich der Effekt, der in der Shuttle-Box 5 Wochen nach Toleranzentwicklung nachweisbar war, nach 10 Wochen nicht eindeutig bestätigen.

Für die Versuche an der Y-Kammer wurde das Protokoll modifiziert. Da bereits zuvor sowohl bei naiven als auch bei chronisch mit Kochsalz vorbehandelten Tieren nach Kurzzeit-Abstinenz kein Morphineffekt in der Y-Kammer gezeigt werden konnte, wurde nach Langzeit-Abstinenz bewusst auf eine chronische mit Kochsalz vorbehandelte Gruppe an der Y-Kammer verzichtet, da nur begrenzt Tiere zur Verfügung standen. Lediglich chronisch mit Morphin vorbehandelte Tiere wurden daher untersucht. Nach dem Training erfolgte die Zuteilung in die akut zu behandelnden Untergruppen entsprechend der Leistungen. Danach erhielten die Tiere entsprechend ihrer Zuordnung entweder Kochsalz oder 10 mg/kg KG Morphin. Nach 24 Stunden erfolgte das Relearning. Es wurden sowohl die Fehler als auch die Retentionsindizes ausgewertet. Zusätzlich wurden die Zunahmen richtiger Wechsel analysiert. Die Ergebnisse sind graphisch in den Abbildungen 20 und 21 dargestellt.

Die Trainingsfehler demonstrieren die sehr ausgeglichene Verteilung der Tiere entsprechend ihrer Leistungen auf beide Gruppen, sodass es keine signifikanten Unterschiede gab.

Im Relearning wurde dann eine interessante Beobachtung gemacht. Erstaunlicherweise zeigte sich hier die Tendenz eines gegenteiligen Effektes im Vergleich mit der Kurzzeit-Abstinenz. Vier Wochen nach Toleranzentwicklung waren die Retentionsindizes und die Zunahmen richtiger Wechsel bei den akut

mit Morphin behandelten Tieren signifikant geringer als bei den Kontrolltieren (in der chronischen Morphingruppe).

Nun zeigte sich aber ein numerisch höherer Retentionsindex bei den akut mit Morphin behandelten Tieren im Vergleich mit Kontrolltieren, was sich auch in numerisch weniger Fehlern im Relearning ausdrückte.

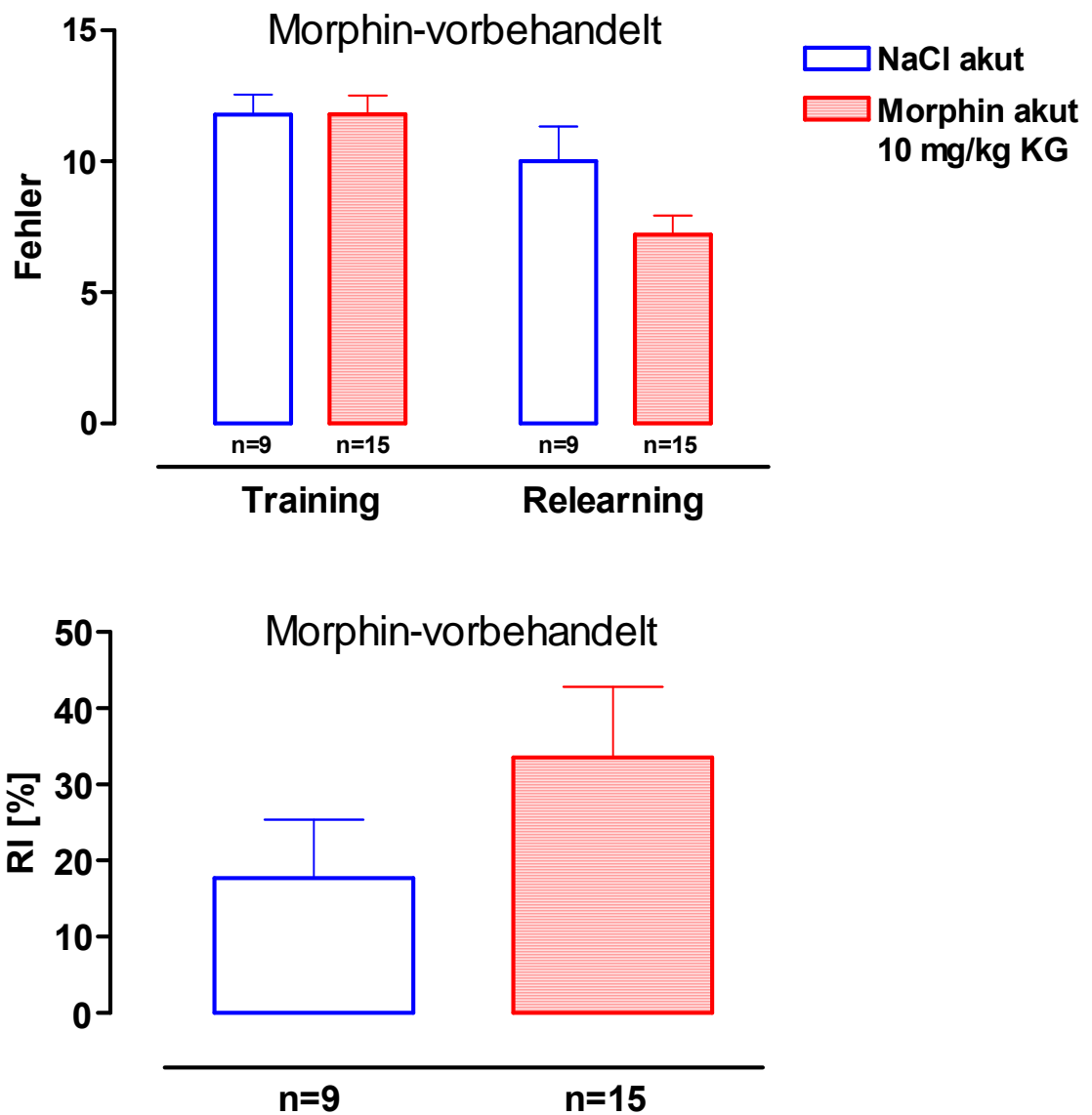


Abb. 20: akuter Morphineffekt auf Fehler und Retentionsindex vorbehandelter Tiere in der **Y-Kammer**
(16 Wochen nach Ende der Vorbehandlung)
($\bar{X} \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY)

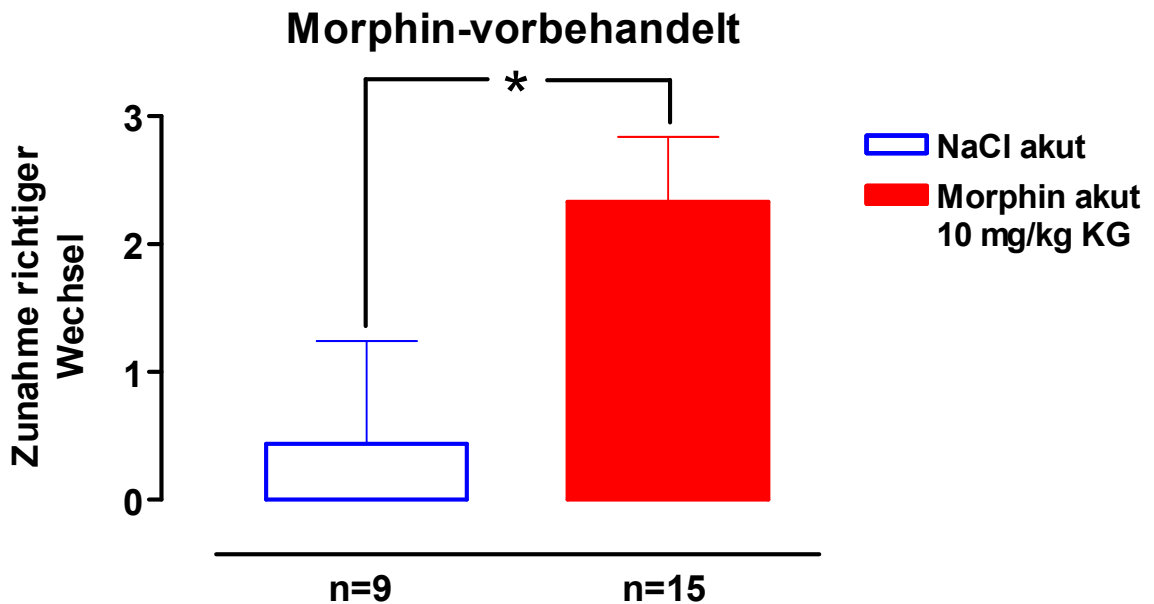


Abb. 21: akuter Morphineffekt auf die Zunahme richtiger Wechsel vorbehandelter Tiere in der **Y-Kammer** (16 Wochen nach Ende der Vorbehandlung)
($X \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY, $*p=0,035$)

Auch die Zunahme richtiger Wechsel war in der akut mit Morphin behandelten Gruppe deutlich höher als in der akut mit Kochsalz behandelten Gruppe. Dieser Unterschied erreichte sogar das Signifikanzniveau. Die Ergebnisse könnten auf eine Effektinversion nach 16 Wochen im Vergleich mit den Ergebnissen nach vier Wochen hindeuten.

Um neben Veränderungen der Retention und chronischen Morphin-Effekten auf die Aktivität auch direkte Einflüsse auf das dopaminerge System zu untersuchen, wurden Tiere zusätzlich in einem Apomorphin-MOTI®-Test untersucht. Chronisch mit Kochsalz oder Morphin vorbehandelte Tiere wurden nach einer behandlungsfreien Zeit von 10 Wochen getestet. Wie bei der Morphin-MOTI®-Untersuchung wurden während der Habituation die Tiere ohne akuten Substanzeinfluss beobachtet. Im Test hatten dann alle Tiere beider chronisch vorbehandelter Gruppen 0,7 mg/kg KG des Dopamin-Agonisten Apomorphin vor Testbeginn erhalten. Es wurden die Gesamtaktivitäten über 15 min erfasst. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 22 und 23 dargestellt.

Die Gesamtaktivitäten der beiden vorbehandelten Gruppen unterschieden sich nicht während der Habituation, was bedeutet, dass die chronische Vorbehandlung keinen nachweisbaren Einfluss auf die Motilität hatte. Das ist

auch plausibel, da die Morphinvorbehandlung bereits nach 5 Wochen keinen Effekt auf die Aktivität in der Habituation gezeigt hatte. Nach akuter Apomorphingabe stellte sich allerdings eine zumindest tendenziell höhere Gesamtaktivität in der chronisch mit Morphin vorbehandelten Gruppe dar.

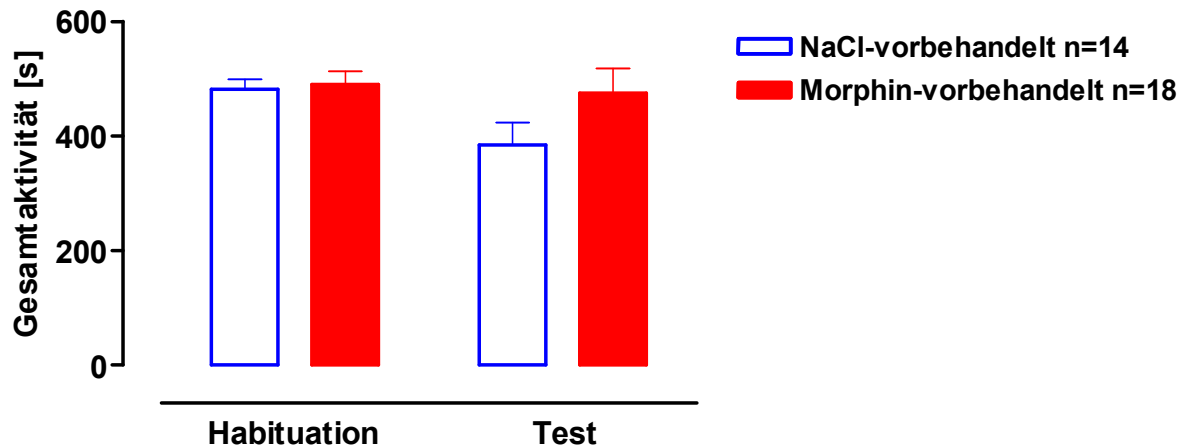


Abb. 22: akuter Apomorphineffekt (0,7 mg/kg KG Apomorphin im Test für beide Gruppen) auf die Gesamtaktivität vorbehandelter Tiere im **MOTI®-System** (10 Wochen nach Ende der Vorbehandlung)
($X \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY)

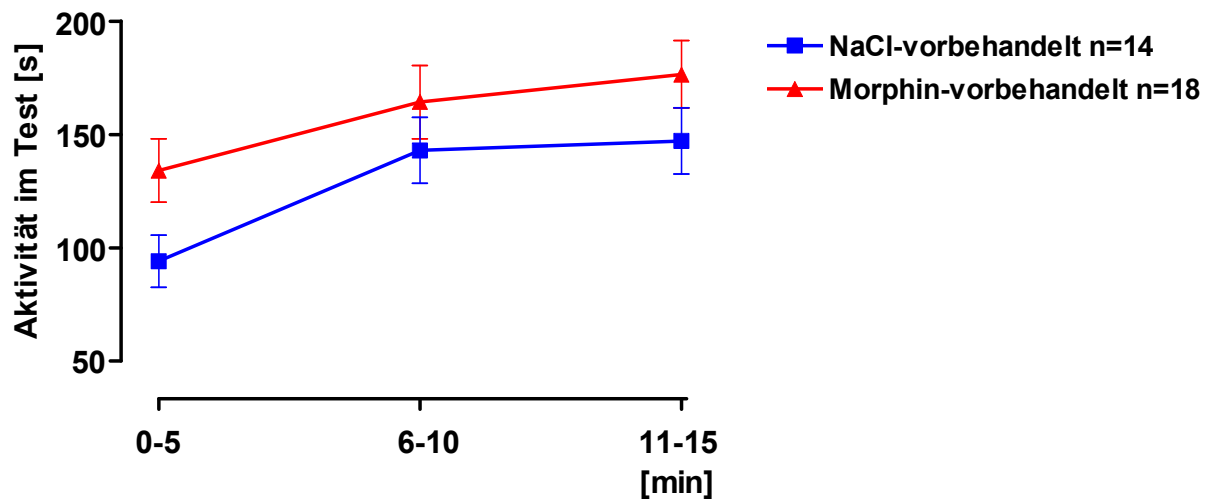


Abb. 23: akuter Apomorphineffekt (0,7 mg/kg KG Apomorphin im Test für beide Gruppen) auf die Aktivität vorbehandelter Tiere im **MOTI®-System** (10 Wochen nach Ende der Vorbehandlung)
($X \pm \text{SEM}$, repeated measures ANOVA)

Die Auswertung der Aktivitäten in 5-min-Intervallen erweckte im Test den Eindruck eines Unterschiedes zwischen beiden Gruppen innerhalb des ersten Intervalls, wobei die Einzelaktivitäten der chronischen Morphingruppe höher waren als die der Kontrollgruppe. Tatsächlich zeigte sich in der statistischen Auswertung der Intervalle in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit ein

entsprechender Trend ($F_{1,30}=3,529$, $p=0,070$). In beiden Gruppen erhöhten sich darüber hinaus die Einzelaktivitäten im Verlauf als Ausdruck des stimulierenden Apomorphineffektes.

Dies zeigt, dass nach einer Abstinenzzeit von 10 Wochen keine opioden Effekte auf die Gesamtaktivität zu verzeichnen sind, wenn keine weiteren Substanzen zusätzlich akut appliziert werden. Wird allerdings Apomorphin als Dopamin-Agonist akut gegeben, so ergibt sich ein Trend für eine stärkere Stimulation der mit Morphin vorbehandelten Tiere.

3.2.2. Etonitazen-vorbehandelte Tiere

3.2.2.1. Kurzzeit-Intervall: 5 Wochen nach Ende der Vorbehandlung

In Analogie zur chronischen Morphinvorbehandlung wurden naive Tiere in zwei Gruppen randomisiert und entsprechend ihrer Zuordnung über einen Zeitraum von vier Wochen mit Kochsalz oder 10 µg/kg KG Etonitazen vorbehandelt. Nach 5 Wochen Abstinenz erfolgten dann die Versuche. Tiere aus jeder Vorbehandlungsgruppe wurden in der Shuttle-Box oder in der Y-Kammer in einem Training getestet und entsprechend ihrer Leistungen auf die akuten Untergruppen verteilt. In den Shuttle-Box-Experimenten erhielten die Tiere beider Gruppen sofort nach dem Training entsprechend ihrer Zuordnung entweder Kochsalz oder 10 µg/kg KG Etonitazen. Nach 24 Stunden erfolgte das Relearning. Dabei kamen sowohl die bedingten Reaktionen als auch die Retentionsindizes zur Auswertung. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 24 dargestellt.

Die Trainingsergebnisse zeigten keine Unterschiede in der Anzahl der bedingten Reaktionen in den beiden chronisch vorbehandelten Gruppen. Dies verdeutlicht, dass eine chronische Etonitazenvorbehandlung nach einer Abstinenz von 5 Wochen keinen Einfluss auf die Leistungen im Training hatte. Die Aufteilung der Tiere in die akut zu behandelnden Untergruppen war gleichmäßig erfolgt.

Im Relearning zeigten sowohl die Tiere der mit Kochsalz vorbehandelten Gruppe als auch die Tiere der mit Etonitazen vorbehandelten Gruppe deutlich mehr bedingte Reaktionen als im Training, ohne signifikante Unterschiede

zwischen den jeweiligen Untergruppen (akute Kochsalzgruppe und akute Etonitazengruppe).

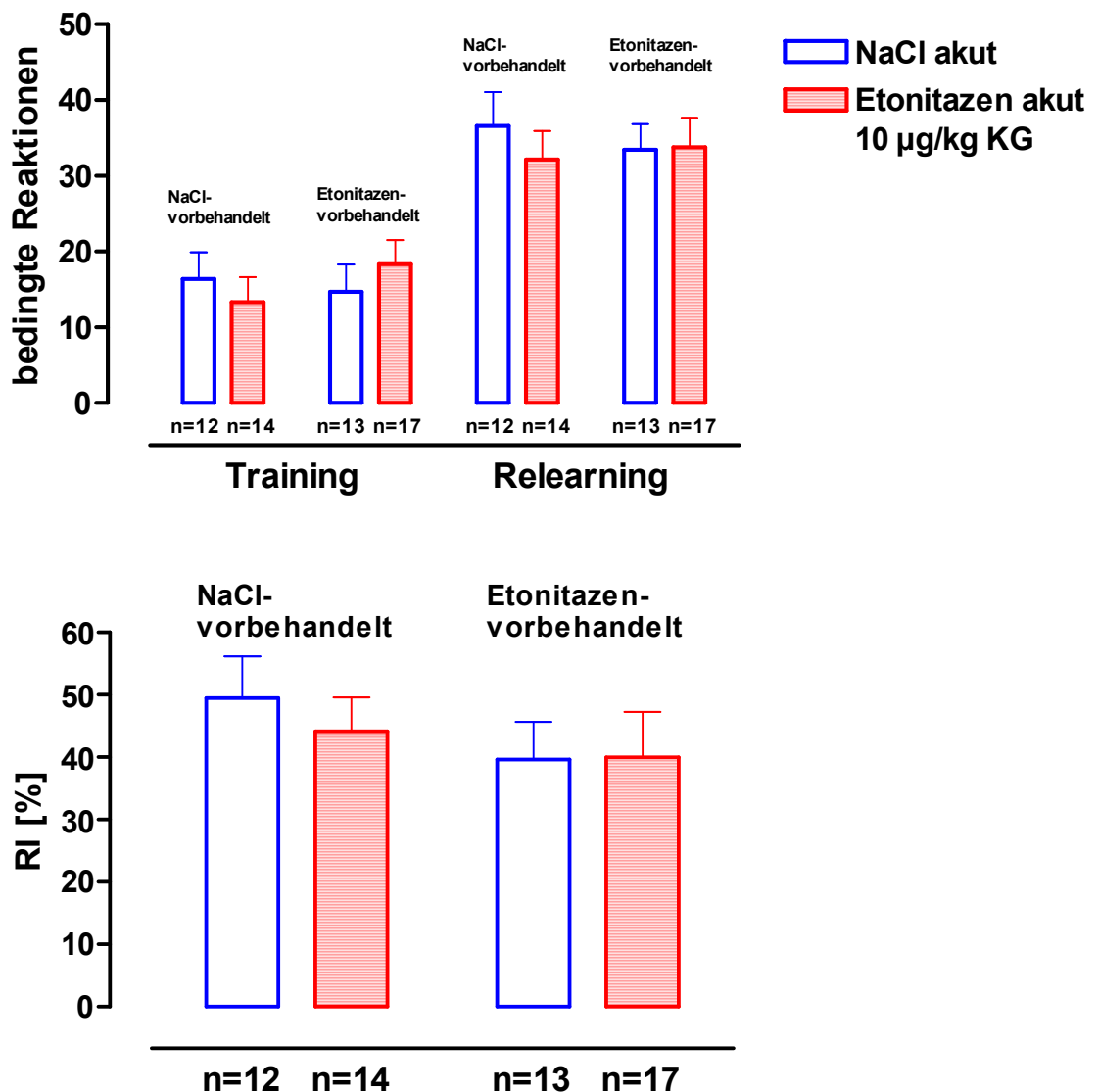


Abb. 24: akuter Etonitazeneffekt auf den Retentionsindex vorbehandelter Tiere in der **Shuttle-Box**
(5 Wochen nach Ende der Vorbehandlung)
($\bar{X} \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY)

Ebenfalls zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Retentionsindizes der im Lernversuch akut mit Etonitazen behandelten Tiere und den Kontrolltieren. Dies galt sowohl für die chronische Kochsalz- als auch für die chronische Etonitazengruppe. Auch zwischen diesen beiden Gruppen gab es keine Unterschiede. Ein Effekt auf die Retention an der Shuttle-Box ließ

sich somit weder für chronisch mit Kochsalz noch mit Etonitazen vorbehandelte Tiere zeigen. Diese Ergebnisse sind mit den Resultaten aus den Untersuchungen der akuten Wirkung von Etonitazen auf naive Tiere an der Shuttle-Box vergleichbar.

Für die Untersuchungen an der Y-Kammer erfolgte wie bei den vorherigen Versuchen die Zuteilung der vorbehandelten Tiere entsprechend ihrer Leistungen auf die akuten Behandlungsgruppen. Nach dem Training erhielten die Tiere der beiden vorbehandelten Gruppen entsprechend ihrer Zuordnung entweder Kochsalz oder 10 µg/kg KG Etonitazen. 24 Stunden später erfolgte das Relearning. Es wurden sowohl die Fehler als auch die Retentionsindizes ausgewertet. Zusätzlich wurden die Zunahmen richtiger Wechsel analysiert. Die Ergebnisse sind graphisch in den Abbildungen 25 und 26 dargestellt.

Beim Vergleich der Trainingsfehler der chronisch vorbehandelten Gruppen ergab sich der Eindruck, dass Tiere, die mit Etonitazen vorbehandelt wurden, mehr Fehler machten als die Tiere der Kontrollgruppe. Dies ließ sich statistisch jedoch nicht sichern. Innerhalb der akuten Untergruppen waren die Tiere gleichmäßig verteilt.

Im Relearning machten sowohl Tiere der vorbehandelten Kochsalzgruppe als auch Tiere der vorbehandelten Etonitazengruppe signifikant mehr Fehler, wenn sie akut nach dem Training Etonitazen erhalten hatten (im Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle). Diese Retentionsverschlechterung zeigte sich auch in einem signifikant geringeren Retentionsindex bei den akut mit Etonitazen behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies galt sowohl für die chronisch mit Etonitazen als auch die chronisch mit Kochsalz vorbehandelten Tiere. Vergleichbares war bei der Zunahme richtiger Wechsel zu beobachten, die bei den akut mit Etonitazen behandelten Tieren signifikant geringer ausfielen als bei den Kontrolltieren. Auch dieser Effekt war für beide chronischen Gruppen nachweisbar. Signifikante Unterschiede zwischen den vorbehandelten Gruppen hinsichtlich Fehler im Relearning, Retentionsindex und Zunahme richtiger Wechsel waren nicht nachweisbar, was bedeutet, dass eine akute Etonitazenapplikation die Retention sowohl der Kontrolltiere als auch der mit Etonitazen vorbehandelten Tiere an der Y-Kammer gleichermaßen beeinflusste.

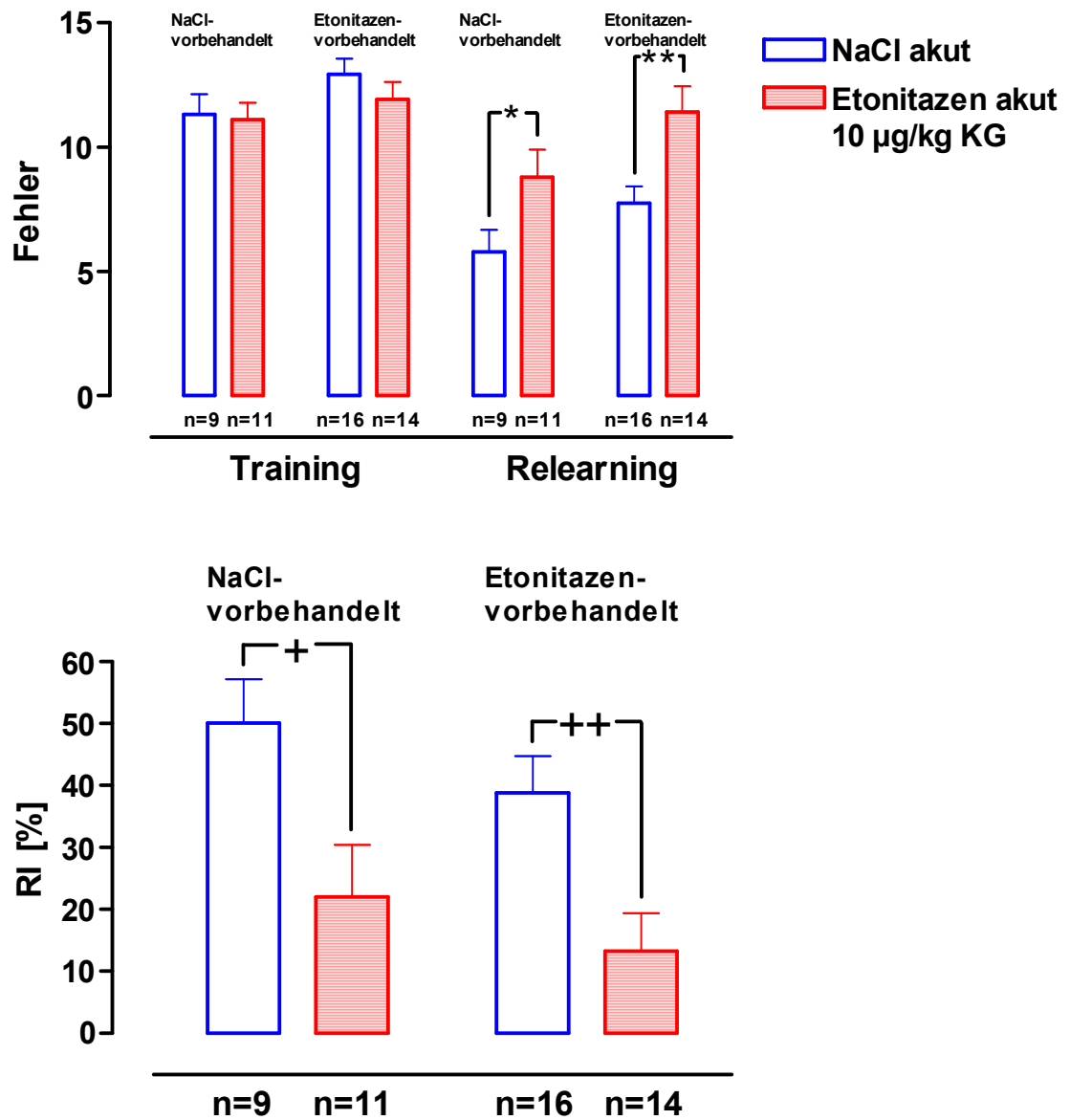


Abb. 25: akuter Etonitazeneffekt auf den Retentionsindex vorbehandelter Tiere in der **Y-Kammer** (5 Wochen nach Ende der Vorbehandlung)
($\bar{X} \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY, *p=0,046 **p=0,003 +p=0,016 ++p=0,004)

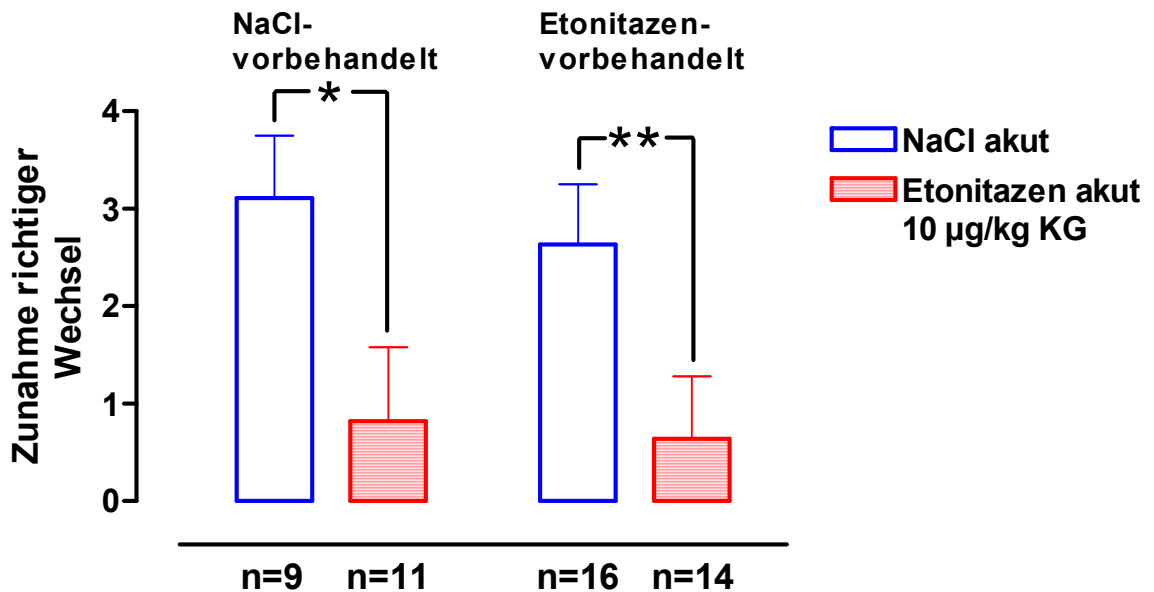


Abb. 26: akuter Etonitazeneffekt auf die Zunahme richtiger Wechsel vorbehandelter Tiere in der Y-Kammer (5 Wochen nach Ende der Vorbehandlung)
($\bar{X} \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY, * $p=0,046$ ** $p=0,031$)

Um neben der Veränderung der Gedächtnisretention auch chronische Etonitazen-Effekte auf die Aktivität zu untersuchen, wurden Tiere zusätzlich in einer Motilitätsmesskammer getestet. Wie im Morphin-Versuch beschrieben, wurden naive Tiere in zwei Gruppen randomisiert und entsprechend ihrer Zuordnung chronisch mit Kochsalz oder Etonitazen vorbehandelt. Nach 5 Wochen Abstinenz wurden die Versuche durchgeführt. Während der Habituation wurden die Aktivitäten der Tiere ohne akuten Substanzeinfluss registriert. Im eigentlichen Test wurden alle Tiere beider chronischer Gruppen mit einer Dosis von 10 µg/kg KG Etonitazen vor Testbeginn behandelt. Es wurden die Gesamtaktivitäten über 15 min erfasst. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 27 und 28 dargestellt.

Die Gesamtaktivitäten der vorbehandelten Gruppen unterschieden sich nicht während der Habituation. Dies zeigt, dass Etonitazen nach chronischer Gabe und einer Abstinenzzeit von 5 Wochen keinen Effekt auf die Aktivität der Tiere hatte. Auch nach akuter Etonitazenapplikation im Test gab es zwischen beiden vorbehandelten Gruppen keine Unterschiede. Allerdings zeigte sich hier eine deutliche Verringerung der Gesamtaktivitäten im Vergleich mit der Habituation, was ein Ausdruck des starken depressiven Effektes von Etonitazen ist.

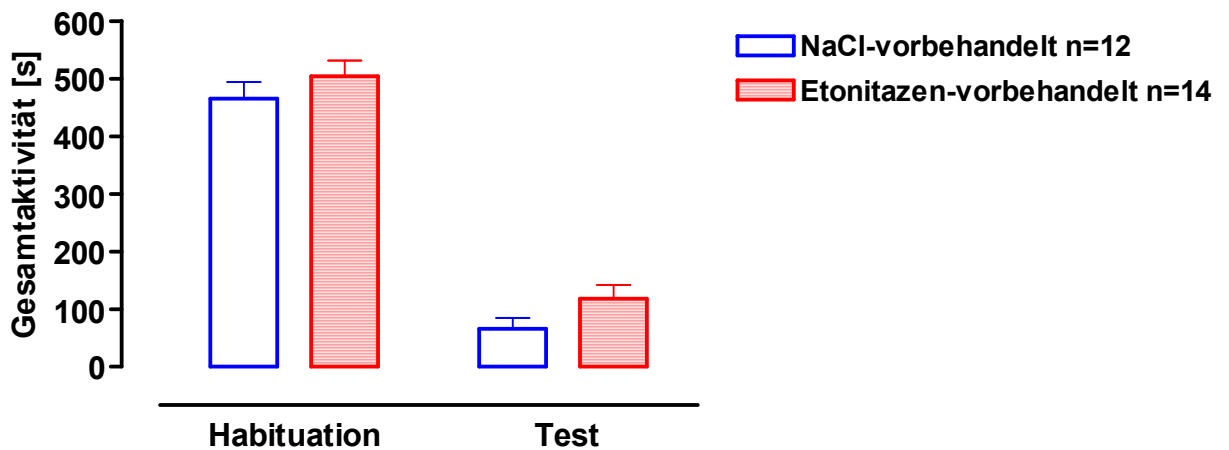


Abb. 27: akuter Etonitazeneffekt (10 µg/kg KG Etonitazen im Test für beide Gruppen) auf die Gesamtaktivität vorbehandelter Tiere im **MOTI®-System** (5 Wochen nach Ende der Vorbehandlung)
($\bar{X} \pm \text{SEM}$, U-Test nach MANN-WHITNEY)

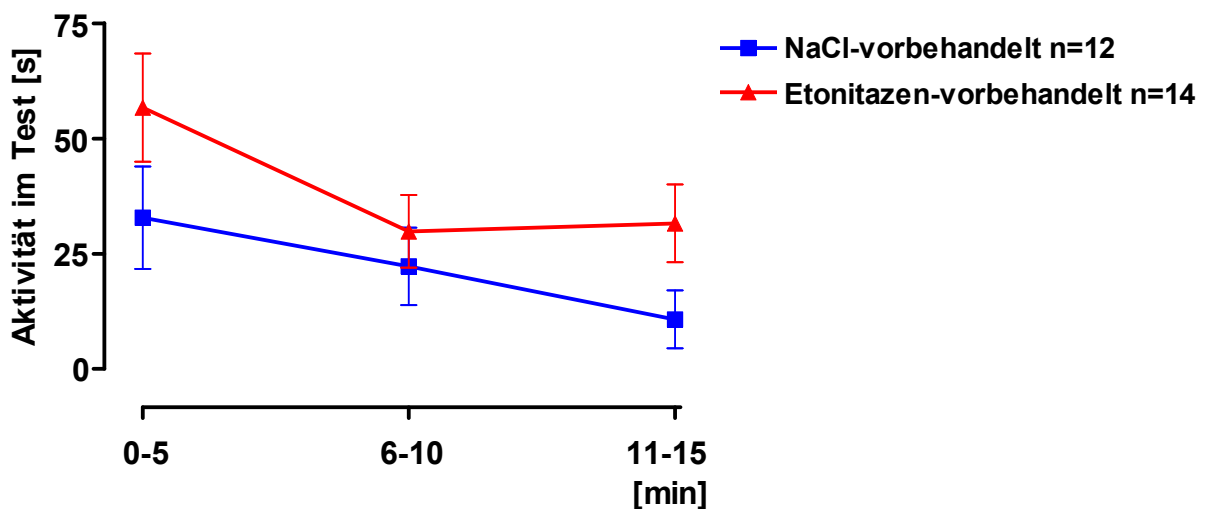


Abb. 28: akuter Etonitazeneffekt (10 µg/kg KG Etonitazen im Test für beide Gruppen) auf die Aktivität vorbehandelter Tiere im **MOTI®-System** (5 Wochen nach Ende der Vorbehandlung)
($\bar{X} \pm \text{SEM}$, repeated measures ANOVA)

Da die Gesamtaktivität der mit Kochsalz vorbehandelten Tiere sich im Test nicht von der Gesamtaktivität der mit Etonitazen vorbehandelten Tiere unterschied, war auch in der Auswertung der Aktivitäten in 5-min-Intervallen kein signifikanter Unterschied zu erwarten. Die Ergebnisse bestätigten dies. Es war allerdings eine deutliche Abnahme der Aktivitäten über den gesamten

Zeitraum nachweisbar als Ausdruck des sedativen Etonitazeneffektes und der Gewöhnung an die Testumgebung.

Es ließ sich daher insgesamt zeigen, dass Etonitazen nach chronischer Vorbehandlung die Motilität der Tiere nicht beeinflusste. Eine akute Etonitazenapplikation hatte zwar deutliche depressive Auswirkungen auf die Aktivitäten, aber unabhängig davon, wie die Tiere vorbehandelt wurden.

3.2.2.2. Langzeit-Intervall: 10 Wochen nach Ende der Vorbehandlung

Da die Ergebnisse der Kurzzeitabstinenz-Tiere mit denen der naiven Etonitazentiere korrespondierten, wurde auf weitere Untersuchungen an der Shuttle-Box sowie der Y-Kammer nach einer Abstinenzzeit von 10 Wochen bewusst verzichtet, da keine anderen Effekte mehr zu erwarten waren.

Um jedoch neben der Veränderung der Retention sowie chronischer Etonitazen-Effekte auf die Aktivität auch direkte Einflüsse auf das dopaminerge System zu untersuchen, wurden Apomorphin-MOTI®-Tests durchgeführt. Dazu wurden chronisch mit Kochsalz oder Etonitazen vorbehandelte Tiere nach 10 Wochen Abstinenz untersucht. Während der Habituation waren die Tiere ohne akuten Substanzeinfluss. Im eigentlichen Test wurden alle Tiere beider chronisch vorbehandelter Gruppen mit einer Dosis von 0,7 mg/kg KG Apomorphin behandelt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 29 und 30 dargestellt.

Die Gesamtaktivitäten der beiden vorbehandelten Gruppen unterschieden sich nicht während der Habituation, was den Ergebnissen nach 5 Wochen Abstinenzzeit entsprach.

Auch im Test zeigten sich zwischen den beiden vorbehandelten Gruppen keinerlei Unterschiede, weder in der Gesamtaktivität noch in den einzelnen Beobachtungsintervallen. Eine Aktivitätszunahme über den gesamten Versuchszeitraum war nachweisbar, was auf den stimulierenden Apomorphineffekt zurückzuführen ist.

Während also Apomorphin nach 10 Wochen an den mit Morphin vorbehandelten Tieren einen Trend zu einer höheren Stimulation zeigte, war an den mit Etonitazen vorbehandelten Tieren kein Effekt nachweisbar.

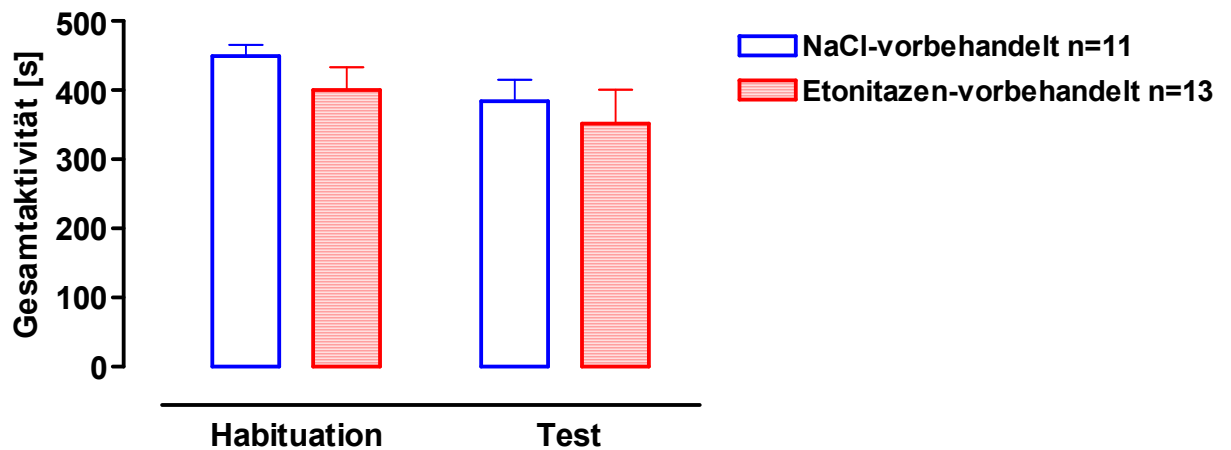


Abb. 29: akuter Apomorphineffekt (0,7 mg/kg KG Apomorphin im Test für beide Gruppen) auf die Gesamtaktivität vorbehandelter Tiere im **MOTI®-System** (10 Wochen nach Ende der Vorbehandlung) (X ± SEM, U-Test nach MANN-WHITNEY)

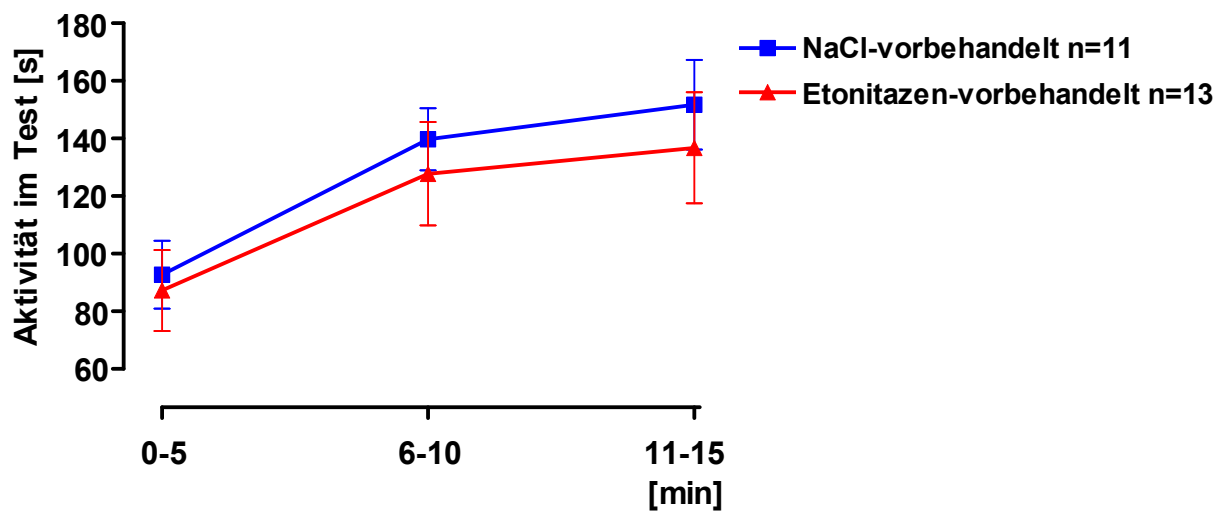


Abb. 30: akuter Apomorphineffekt (0,7 mg/kg KG Apomorphin im Test für beide Gruppen) auf die Aktivität vorbehandelter Tiere im **MOTI®-System** (10 Wochen nach Ende der Vorbehandlung) (X ± SEM, repeated measures ANOVA)

4. Diskussion

Die Rolle von Opioiden hinsichtlich Lernen und Gedächtnis ist seit vielen Jahren sehr intensiv untersucht worden. So wurde in einer Reihe von Arbeiten gezeigt, dass Morphin die Lernleistung verschlechtert, wenn es direkt nach einem Lernversuch appliziert wird (35). Einige andere Autoren kamen jedoch zu gegenteiligen Ergebnissen (76,77). Die verwendeten Lernmodelle differierten allerdings in den verschiedenen Untersuchungen stark, ebenso wie die eingesetzten Dosierungen, Applikationsformen und -zeiten.

Um eine Allgemeingültigkeit der Lernmodulation durch Opioide zu überprüfen, untersuchten wir daher männliche Wistar-Ratten an zwei etablierten Lernmodellen mit unterschiedlichen neurophysiologischen Grundlagen. Dabei setzten wir die beiden Opioid-Agonisten Morphin und Etonitazen in unterschiedlichen Dosierungen ein. Zusätzlich wurden Lernversuche mit dem Opioid-Antagonisten Naloxon durchgeführt.

Wir konnten zeigen, dass Morphin in einer hohen Dosierung (10 mg/kg KG) eine akute Störung des Gedächtnisses bei naiven Tieren in der Shuttle-Box induziert, wenn es sofort nach dem Training appliziert wurde. Kleinere Dosierungen wie 2,5 und 5 mg/kg KG hatten dagegen keinen Einfluss. Dies widerspricht einer älteren Untersuchung, die bereits für die sehr geringe Dosis von 1 mg/kg KG eine akute Retentionshemmung an der Shuttle-Box nachwies (38). In dieser Untersuchung wurde allerdings Morphin intraperitoneal (i.p.) appliziert, während unsere Tiere Morphin ausschließlich subcutan (s.c.) erhielten. Bei i.p. Applikation wird Morphin schneller resorbiert und bewirkt höhere Spitzenspiegel als nach s.c. Verabreichung, bei der die Pharmakokinetik verändert ist (langsamere Resorption und kleinere Spitzenspiegel). Somit lässt sich möglicherweise erklären, weshalb in der älteren Arbeit die geringe Absolutdosis von 1 mg/kg KG (i.p.) die Retention an der Shuttle-Box stören konnte, wohingegen selbst unsere mittlere Dosis von 5 mg/kg KG (s.c.) diesen Effekt nicht zeigte.

Da unter unseren gewählten Bedingungen 10 mg/kg KG Morphin effektiv waren, um Störungen der Retention zu induzieren, entschieden wir uns, den zweiten Opioid-Agonisten Etonitazen in der äquieffektiven Dosierung von 10 µg/kg KG an der Shuttle-Box zu überprüfen. Um einen möglichen Effekt bei 5 µg/kg KG Etonitazen nicht zu übersehen, wurde diese Dosis zusätzlich

eingesetzt. Zu unserer Überraschung hatte im Gegensatz zu Morphin keine der beiden Etonitazendosen einen Einfluss auf die Retention in der Shuttle-Box. Diese Diskrepanz ist auf den ersten Blick schwer zu erklären. Beide Opioide haben eine vergleichbare Pharmakokinetik. Sie wurden darüber hinaus in äquianalgetischen Dosierungen eingesetzt. Schließlich kamen in beiden Versuchen exakt dieselben Tierzahlen zum Einsatz (je 19 Kontroll- und 17 Verumtiere), sodass ein Unterschied durch die Powerung der Untersuchungen nicht erklärbar ist. Die Diskrepanz könnte daher möglicherweise in der pharmakodynamischen Wirkung beider Substanzen liegen. Zur weiteren Klärung der Frage werden die Ergebnisse aus den Versuchen an der Y-Kammer hinzugezogen. In diesen Untersuchungen zeigte sich, dass Morphin selbst in der hohen, an der Shuttle-Box effektiven Dosierung von 10 mg/kg KG, an der Y-Kammer keinen Einfluss auf das Gedächtnis hatte. Etonitazen hingegen, das an der Shuttle-Box ohne Effekt auf die Retention war, erzeugte an der Y-Kammer eine deutliche Gedächtnisstörung.

Diese Ergebnisse lassen zwei Schlüsse zu. 1. Die beiden Opioid-Agonisten Morphin und Etonitazen haben unterschiedliche modulierende Eigenschaften auf die Konsolidierung, da sie bei ein und demselben Lernmodell unterschiedliche Effekte zeigen. 2. Die beiden Modelle selbst müssen in ihren neurophysiologischen Grundlagen hinsichtlich der Gedächtnisbildung verschieden sein, da ansonsten keine gegenteiligen Effekte der beiden Opioide möglich sein sollten. Wenn Morphin also an der Shuttle-Box effektiv ist und an der Y-Kammer nicht (und umgekehrt bei Etonitazen), muss es einen Unterschied zwischen beiden Lernmodellen geben.

Dass Ergebnisse von Lernversuchen von den jeweiligen Modellen abhängen, ist lange bekannt (78). Es ist ebenfalls plausibel, dass Opioide in gleichen Lernmodellen unterschiedlich wirksam sein können, wenn beispielsweise ihr Rezeptorprofil verschieden ist. Dies ist bei Morphin und Etonitazen tatsächlich der Fall. Beide sind hochaffin an MOP agonistisch wirksam, an DOP und KOP verhalten sie sich aber unterschiedlich. Morphin zeigt hier eine deutliche Wirkung, Etonitazen jedoch nicht. Es konnte eindrucksvoll demonstriert werden, dass Etonitazen an MOP etwa 11650fach stärker als an KOP bindet, sowie 8800fach stärker als an DOP (72). Weiterhin wurde gefunden, dass Etonitazen

im Gegensatz zu Morphin neben seiner hohen MOP-Selektivität eine viel höhere Affinität für den Subtyp MOP₁ besitzt als für MOP₂ (79).

Ein weiterer Unterschied auf molekularpharmakologischer Ebene liegt in der Fähigkeit, MOP zu internalisieren. So wurde nachgewiesen, dass Etonitazen effektiv in der Lage ist, nach Bindung an MOP eine Rezeptorendozytose zu induzieren. Morphin besitzt diese Eigenschaft jedoch kaum (80). Dies wird als eine der Ursachen der hohen Toleranzentwicklung und Rezeptordesensibilisierung von Morphin diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass Etonitazen eine deutlich geringere Toleranzentwicklung induziert als Morphin (71). Ob diese unterschiedlichen Eigenschaften eine Erklärung für unsere Beobachtungen bei einer einmaligen akuten Opioidanwendung an Shuttle-Box und Y-Kammer sein können, ist allerdings spekulativ.

Es konnte nachgewiesen werden, dass bei vielen Lernversuchen während der Trainingseinheit β -Endorphin freigesetzt wird, unabhängig ob es sich um Versuche mit schmerzvollen Stimuli handelt oder nicht (81). Die Menge des freigesetzten β -Endorphins liegt allerdings in Größenordnungen, bei der keine analgetische Wirksamkeit gegeben ist, aber sie ist ausreichend groß, um retrograd amnestisch zu wirken (82). Beim Lernen wird also physiologisch der Informationserwerb negativ moduliert, möglicherweise um eine zu hohe Informationsflut während der Konsolidierung zu verhindern (83). Es ist zwar bekannt, dass β -Endorphin auch bei schmerzlosen Stimuli freigesetzt wird, es ist aber nicht klar, ob dessen Menge bei schmerzreizinduzierten Lernversuchen (insbesondere für die Y-Kammer existieren dazu keine Daten) möglicherweise stärker erhöht wird. Dies wäre plausibel, da zwar keine Analgesie zu erwarten ist, wohl aber eine höhere amnestische Wirkung, die bei aversiven Reizen sinnvoll wäre.

Da beim Erlernen einer bedingten Reaktion in der Shuttle-Box prinzipiell eine Vermeidung des Stromreizes für das Tier möglich ist, ergibt sich folgende Situation: Tiere mit konstitutionell geringer Leistung erhalten durch ihre hohe Fehlerzahl im Training viele Fußreize. Wenn, wie von uns vermutet, daraus eine erhöhte β -Endorphin-Freisetzung resultiert, dann könnte dessen amnestische Wirkung die weitere Retention stören. Tiere, die hingegen konstitutionell eine hohe Trainingsleistung zeigen, werden mit deutlich weniger Fußreizen bestraft. Demnach wird bei ihnen eine geringere amnestische β -Endorphin-Wirkung zu

erwarten sein. Es kann also an der Shuttle-Box bereits im Training eine selbstverstärkende Wirkung durch das Lernmodell selbst (im engeren Sinne die Stromreize) vermutet werden. Die Tiere, welche schon im Training an der Shuttle-Box schlechte Leistungen zeigen, werden möglicherweise im Relearning durch die im Training vermittelte Amnesie (durch die vielen Fußreize) besonders schlecht abschneiden. Die Tiere, die im Training besonders gut sind, könnten auch im Relearning sehr gute Ergebnisse erzielen, da bei ihnen im Training ein geringerer amnestischer Effekt (durch weniger Fußreize) zu erwarten ist. Allerdings versuchten wir dieses Problem zu eliminieren, indem den akuten Behandlungsgruppen Tiere mit gleichen Trainingsleistungen zugeordnet wurden.

Anders verhält es sich in der Y-Kammer. Hier besteht für das Tier nicht die Möglichkeit, den Fußreiz zu vermeiden. Sowohl Tiere mit guter als auch schlechter Leistung im Training werden gleichermaßen Strafreizen ausgesetzt. Zwar kann das Tier durch korrekte Hell-Dunkel-Diskriminierung den Fußreiz verkürzen, eine möglicherweise gesteigerte β -Endorphin-Freisetzung kann damit aber nicht verhindert werden. Während also in der Shuttle-Box bei einem gut lernenden Tier im Training die Konsolidierung weitestgehend ungestört ablaufen kann (durch Fußreizverhinderung), besteht diese Möglichkeit für gleichermaßen gut lernende Tiere in der Y-Kammer weniger. Tiere mit guter Leistung in der Y-Kammer sind demnach möglicherweise benachteiligt im Vergleich mit denen in der Shuttle-Box.

Die theoretischen Überlegungen führen zu der Schlussfolgerung, dass in beiden Lernversuchen prinzipbedingt verschiedene Mengen von β -Endorphin freigesetzt werden können, die nur teilweise von der Trainingsleistung der Tiere abhängen. Somit kann in beiden Lernmodellen ein unterschiedlicher zerebraler Grundzustand angenommen werden, wie er bereits vor mehr als 30 Jahren beschrieben wurde (84). Dieser Zustand, der im Wesentlichen durch β -Endorphin bedingt sein soll, wird als Grundlage für unterschiedliche Ergebnisse in verschiedenen Lernmodellen bei gleichen Tieren unter vergleichbaren Voraussetzungen angesehen. Ob dies auch für unterschiedliche Wirkstoffe mit ähnlichen Eigenschaften zutrifft ist bislang unbekannt, könnte aber aufgrund unserer Ergebnisse vermutet werden. Wie allerdings ein solch unterschiedlicher, β -Endorphin-bedingter Grundzustand auf molekularer Ebene

mit Morphin und Etonitazen interagiert, muss noch untersucht werden. Dass die Internalisierungseigenschaften der beiden Opiode bei lediglich einmaliger Anwendung für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein könnten, ist eher schwer vorstellbar, aber nicht auszuschließen. Möglicherweise spielt auch die stärkere MOP-selektive Wirkung von Etonitazen eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Morphin und Etonitazen die neuronale Dopaminfreisetzung, die als wichtiger modulierender Mechanismus bei der Gedächtnisbildung gilt, gleichermaßen positiv beeinflussen (85).

Zusätzlich sollte ein weiterer Aspekt hinsichtlich der Lernmodellgrundlagen diskutiert werden. Die Tiere stehen sowohl in der Shuttle-Box als auch in der Y-Kammer vor einem Konflikt. In der Shuttle-Box erhalten die Tiere, wenn sie nach Einsetzen des Ton- und Lichtimpulses nicht rechtzeitig die Hürde überwinden, einen Fußreiz. Der Sprung ins helle Kompartiment beendet den Strafreiz und bedeutet für das Tier Sicherheit. Nun wird jedoch in diesem scheinbar sicheren Bereich ein Stromimpuls aktiviert, wenn der nächste Lauf gestartet wird und das Tier nach Darbietung des Ton- und Lichtimpulses nicht sofort auf die andere Seite der Hürde wechselt. Dabei muss es nun dorthin springen, wo es vorher schon einmal bestraft wurde. Es gibt also niemals einen Bereich, der während des gesamten Versuches konstant sicher bleibt, da sich unsichere und sichere Kompartimente abwechseln. Dieses als „two-way-avoidance“ bezeichnete Modell beinhaltet somit eine hohe Stresskomponente als Störfaktor für das gesamte Lernexperiment. Da es aber für alle Tiere gleichartig gilt, wird an der Gültigkeit der Testergebnisse nichts verändert. Allerdings ist der direkte Vergleich mit anderen Lernmodellen dann unter Umständen schwieriger. Ein typisches Lernmodell mit einer „one-way-avoidance“ ist der Stabsprung. Dabei können die Tiere einem Fußreiz immer entfliehen, wenn sie an einen über ihnen befestigten Stab springen. Dieser Bereich ist für das Tier grundsätzlich immer sicher.

In der Y-Kammer herrschen ähnliche Verhältnisse wie in der Shuttle-Box. Auch hier wechseln unsichere und sichere Bereiche, allerdings etwas komplexer, da insgesamt drei Kompartimente genutzt werden. Dies verringert gleichzeitig den Stressfaktor, denn das Tier muss im folgenden Lauf nicht sofort in den Arm zurückkehren, indem es zuvor bestraft wurde. Stress stellt beim Lernen einen

sehr wichtigen modulierenden Faktor dar (13,14). Solche Unterschiede zwischen Shuttle-Box und Y-Kammer erklären möglicherweise die verschiedenen Ergebnisse. Zukünftig werden daher weitere Untersuchungen notwendig sein, um die Unterschiede zu erklären.

Im Vergleich zu den akuten Opioidwirkungen war für uns wichtig, welche Rolle der Opioidantagonist Naloxon für die Gedächtniskonsolidierung spielt. Viele sehr widersprüchliche Befunde sind zu diesem Thema bislang publiziert worden. Einige Arbeiten zeigten eine akute Lernverbesserung, wenn Naloxon nach einem Training appliziert wurde (37,86). Andere Autoren fanden, dass diese Wirkung von der getesteten Tierspezies und vom Stamm abhängt (87). Weitere Autoren konnten zeigen, dass möglicherweise nur in unbekannten Lernsituationen Naloxon die Retention verbessert, während in Trainingsitzungen an Lernmodellen, die das Tier bereits kannte, Naloxon ohne Wirkung auf das Gedächtnis war (40).

Da bislang keinerlei Lernversuche mit Naloxon an der Y-Kammer (in der von uns verwendeten Form) verfügbar waren, untersuchten wir dessen Wirkungen mit diesem Modell und führten zum Vergleich ebenfalls Versuche mit Naloxon an der Shuttle-Box durch. Auch wenn für dieses Modell bereits retentionsverbessernde Effekte beschrieben wurden, wollten wir die Wirkungen des Antagonisten und der Agonisten an den gleichen Lernmodellen unter exakt den gleichen Versuchsbedingungen untersuchen.

Entgegen der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen konnten wir jedoch weder an der Shuttle-Box noch an der Y-Kammer positive Effekte von Naloxon auf die Gedächtnisleistung feststellen. An der Shuttle-Box hatten wir Naloxon vor und nach dem Training appliziert, ohne signifikante Wirkungen auf die Retention bestätigen zu können. Es schien sich hier unter der hohen (post-Training) Naloxondosis (10 mg/kg KG) sogar eher ein Trend zu einer Retentionsverschlechterung zu zeigen.

Worin könnte nun diese Diskrepanz zu den Vorgängerarbeiten begründet sein? Messing et al. schreiben, dass der retentionsverbessernde Effekt von Naloxon dosisabhängig sei. Besonders in hohen Konzentrationen könne möglicherweise keine Lernverbesserung mehr nachweisbar sein (37). Tatsächlich hat die Arbeitsgruppe um Izquierdo et al. eher geringe Dosierungen von 0,2-0,8 mg/kg KG Naloxon eingesetzt und darunter retentionsverbessernde Effekte an der

Shuttle-Box beobachtet (38). Allerdings waren die getesteten Gruppen relativ klein (7 Tiere), sodass die Ergebnisse auch zufällig sein könnten. Del Cerro et al. demonstrierten auch in höheren Dosierungen (1-5 mg/kg KG) lernverbessernde Effekte unter Naloxon. Sie verwendeten 84 Tiere in vier Gruppen (ohne genaue Angabe der Tierzahl pro Gruppe). Allerdings verwendeten sie ein anderes Lernmodell (40). Unsere Tiere wurden wie in der Izquierdo-Gruppe an der Shuttle-Box untersucht. Die Anzahl betrug bei der post-Training-Applikation 16 (Kontrollen), 18 (1 mg/kg KG Naloxon) und 16 (10 mg/kg KG). Eine Unterpowerung der Studie ist bei diesen Tierzahlen daher weniger wahrscheinlich. Wir nutzten genau wie Izquierdo und Del Cerro die rasche intraperitoneale Applikation nach der Trainingssitzung, sodass Unterschiede durch eine andere Pharmakokinetik als mögliche Ursache für die beobachtete Diskrepanz ausscheiden. Aufgrund der geringen Tieranzahl in den Versuchen der Izquierdo-Gruppe besteht die Möglichkeit, dass die gemachten Beobachtungen zufällig waren.

Da Naloxon als Antagonist lediglich die Wirkung endogen freigesetzter Opiode hemmen kann, ist unklar ob die Wirkung überhaupt lange genug anhält, da Naloxon eine sehr kurze Halbwertszeit hat. Im Gegensatz dazu besitzen Morphin und Etonitazen modulierende Effekte, die über mehrere Stunden andauern.

Möglicherweise spielt auch die Anzahl der Läufe pro Testeinheit eine Rolle. Wir wissen, dass in einem Training nicht unbegrenzt viele Läufe trainiert werden können. Wenn ein Versuch eine zu hohe Leistung von dem Tier verlangt, führt dies zu keiner weiteren Verbesserung der Gedächtnisretention, sondern kann sich sogar negativ auswirken. Daher sind die Läufe in unserem Versuchsschema in der Shuttle-Box auf maximal 60 begrenzt. In der Y-Kammer werden nur 31 Läufe trainiert. Die Gruppe um Izquierdo hat in ihren Shuttle-Box-Versuchen 50 Läufe von den Tieren pro Testeinheit abverlangt, also vergleichbar mit unserem Protokoll (38). Da bei unseren Versuchen sowohl an der Shuttle-Box als auch an der Y-Kammer vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden, halten wir den fehlenden Effekt von Naloxon auf die Gedächtnisretention nicht für einen Zufallsbefund, sodass der vielfach postulierte retentionsverbessernde Effekt von Naloxon für uns nicht nachvollziehbar ist.

Neben den akuten Effekten von Morphin und Etonitazen interessierten uns auch chronische Wirkungen der beiden Opiode, da gerade die chronische Behandlung in der Schmerztherapie sehr wichtig ist und mögliche Einflüsse auf Lernen und Gedächtnis eine hohe klinische Relevanz besitzen. Daher wurden Tiere entweder mit Morphin oder Etonitazen 4 Wochen lang vorbehandelt und nach einer Abstinenzzeit untersucht. Wir wissen aus früheren Versuchen, dass eine derartige Behandlung eine starke Toleranz gegenüber der Morphinanalgesie erzeugt und gleichzeitig eine Sensibilisierung der motorischen Stimulation (71). Diese Wirkungen sind nach Etonitazengabe jedoch deutlich geringer ausgeprägt.

Die mit Etonitazen vorbehandelten Tiere zeigten nach einer Abstinenz von 5 Wochen keine veränderten Leistungen im Training an der Shuttle-Box und der Y-Kammer, was auf ein normales Lernen hinwies. Bei der Überprüfung der Retention nach erneuter Etonitazengabe konnten an beiden Lernmodellen dieselben Ergebnisse wie schon zuvor bei den naiven Tieren festgestellt werden. Das gleiche galt auch für die Kontrollgruppe, welche lediglich mit Kochsalz chronisch vorbehandelt war. Es ließ sich also demonstrieren, dass eine chronische Etonitazenapplikation keine lang anhaltenden Veränderungen induziert, die mit den beiden von uns verwendeten Lernmodellen nachweisbar wäre. Dies steht möglicherweise im Einklang mit Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass Etonitazen ein geringes Potenzial für Toleranzentwicklung und Sensibilisierung besitzt (71). Dies könnte mit der hohen Internalisierungspotenz von Etonitazen erklärbar sein, die unter Morphin kaum zu beobachten ist (80). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde darauf verzichtet, eine weitere Etonitazen-Gruppe nach einer Abstinenz von 10 Wochen zu untersuchen, da andere Resultate nicht zu erwarten waren und auch nicht plausibel gewesen wären.

Die chronisch vorbehandelte Morphingruppe zeigte nach einer Abstinenz von 5 Wochen an der Shuttle-Box genau wie naive Tiere eine signifikante Gedächtnisstörung, wenn nach dem Training erneut Morphin appliziert wurde. Die Kontrollgruppe allerdings, die lediglich mit Kochsalz vorbehandelt worden war, zeigte unter akutem Morphin keine Retentionsverschlechterung an der Shuttle-Box. Dies widerspricht der Vorstellung, dass sich die Kontrolltiere im Prinzip nicht von naiven Tieren unterscheiden, sodass eigentlich eine

Retentionshemmung erwartet werden müsste, was an den naiven Tieren ja auch deutlich nachweisbar war. Ein wichtiger Unterschied zwischen naiven und chronisch mit Kochsalz vorbehandelten Tieren ist das Alter der Tiere und das Handling. Es scheint, dass der alleinige tägliche Umgang mit den Tieren während der Injektionen über eine gewisse Zeit hinweg einen Schutz vor den retentionsverschlechternden Effekten von Morphin bewirkt, möglicherweise im Sinne einer Präkonditionierung. Die Tiere sind an die Prozedur habituiert und entwickeln möglicherweise weniger Stress. Die hohe Anzahl an verwendeten Tieren (21 Kontroll- und 22 Verumtiere) spricht gegen einen Zufallsbefund.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass sich die chronisch mit Morphin vorbehandelten Tiere wie behandlungsnaive Tiere verhielten, also eine akute Retentionshemmung unter 10 mg/kg KG Morphin zeigten. Da sie dasselbe Handling erfahren hatten wie die mit Kochsalz vorbehandelten Tiere, ist zu diskutieren, ob die tägliche Morphinapplikation möglicherweise die Erinnerung an das Handling während der Vorbehandlung störte und dadurch die chronischen Morphin-Tiere im Lernversuch dasselbe Verhalten zeigten wie behandlungsnaive Tiere.

Ob ein solcher Mechanismus auch an der Y-Kammer eine Rolle spielt, ist ungewiss, da sowohl naive als auch chronische Kontrolltiere an diesem Modell von Morphin nicht im Sinne einer Retentionshemmung beeinflusst wurden. Die chronische Morphingruppe zeigte dagegen auch an der Y-Kammer eine Retentionsstörung, wenn akut Morphin nach dem Training appliziert wurde und reagierte somit empfindlicher als die Kochsalzgruppe. Dieser Effekt spricht möglicherweise für eine Sensitivierung der opioden Wirkung, wie sie auch bei der verstärkten motorischen Antwort bei akuter Morphinapplikation nach einer vorherigen chronischen Morphinbehandlung auftritt (88,89). Das könnte bedeuten, dass die Tiere auch bei den Lernprozessen und der Gedächtnisbildung einem verstärkten Morphineffekt ausgesetzt sind. Dies würde erklären, warum akut verabreichtes Morphin in der chronischen Morphingruppe nicht nur an der Shuttle-Box retentionshemmend wirkte (wie bei den therapienaiven Tieren), sondern darüber hinaus auch an der Y-Kammer.

Um zu überprüfen, wie lange eine solche Veränderung des opioden Systems durch Morphin nach Beendigung der Toleranzentwicklung anhält, wurde eine weitere Gruppe nach einer Abstinenz von 10 Wochen in beiden Lernmodellen

untersucht. Eine Kontrollgruppe wurde nur an der Shuttle-Box geprüft, nicht jedoch an der Y-Kammer, da sich dort schon nach 5 Wochen keine Unterschiede zu den naiven Tieren zeigten und deshalb keine anderen Effekte zu erwarten gewesen wären. Die Kontrollgruppe zeigte auch nach 10 Wochen keine Retentionshemmung an der Shuttle-Box nach akuter Morphinapplikation, was bedeutet, dass der bereits diskutierte mögliche Schutzeffekt durch das Handling weiterhin anhielt. Die chronische Morphingruppe zeigte tendenziell eine Lernhemmung nach akuter Morphingabe, die sich statistisch jedoch nicht sichern ließ. Da in dieser Gruppe allerdings nur 8 Tiere zur Verfügung standen, gehen wir von einer Unterpowerung der Studie aus, da ein fehlender Unterschied nicht plausibel wäre.

In der Y-Kammer zeigte sich ein unerwartetes Ergebnis. Unter akutem Morphin kam es zu einer numerischen Erhöhung des Retentionsindex. Die Zunahme richtiger Wechsel war unter Morphin sogar signifikant erhöht. Da 5 Wochen nach Abstinenz eine Retentionshemmung an der Y-Kammer nachgewiesen wurde, wäre nun allenfalls ein fehlender Effekt im Sinne eines Wirkungsverlustes zu erwarten gewesen, keinesfalls jedoch eine Retentionsverbesserung. Dies widerspricht sämtlichen Untersuchungen hinsichtlich einer akuten Morphinwirkung auf Lernen und Gedächtnis bei Applikation nach einer Trainingssitzung. Es müsste daher in zukünftigen Experimenten überprüft werden, ob sich dieses unerwartete Ergebnis reproduzieren lässt. Allerdings kann es sich auch um einen Zufallsbefund handeln.

Wir werteten also die Ergebnisse nach einer Abstinenz von 10 Wochen an der Shuttle-Box als Lernverschlechterung in der chronischen Morphingruppe (wie auch nach 5 Wochen) und an der Y-Kammer eher als fehlenden Effekt (wie bei naiven Tieren). Dies würde bedeuten, dass die bereits diskutierte Sensitivierung des opioden Systems, die sich nach einer Abstinenz von 5 Wochen zeigte, nach 10 Wochen nicht mehr eindeutig nachweisbar war.

In diesem Zusammenhang darf aber nicht übersehen werden, dass die Tiere, die nach einer Abstinenzzeit von 10 Wochen untersucht wurden, nicht nur älter sondern auch größer und schwerer waren als Tiere, die nach einer Abstinenzzeit von nur 5 Wochen getestet wurden, und somit ein anderes Massenverhältnis vom Körper zum Gehirn hatten. Darüber hinaus ist auch von

einem höheren Körperfettanteil auszugehen, der größere Mengen der lipophilen Opioide binden kann, wodurch bei gleicher Dosierung pro Masse ein geringerer Substanzanteil zentral zur Wirkung gelangt. Wie relevant solche Überlegungen für unsere Tests sind, muss zukünftig genauer untersucht werden.

Opioide bewirken ihre gedächtnismodulierenden Effekte unter anderem durch einen Einfluss auf die dopaminerge Neurotransmission im mesolimbischen System (43,48). Die Beobachtung, dass die Motilität ebenfalls durch Opioide beeinflusst wird, ließ eine Wirkung auch auf die nigrostriatale dopaminerge Neurotransmission vermuten. Dies konnte für Morphin und Etonitazen gezeigt werden (85). Wie lange eine solche motorische Sensitivierung anhält ist nur teilweise bekannt. Ojanen et al. konnten zeigen, dass nach chronischer Morphinapplikation ein positiver Effekt auf die Aktivität bei erneuter Morphinapplikation nach einer Woche nachweisbar war, nach 5 Wochen jedoch nicht mehr (90). Allerdings wurden die Tiere nur zwei Wochen vorbehandelt. Kalivas et al. demonstrierten dagegen eine Erhöhung der Motilität nach 7-tägiger Morphinapplikation, die für 60 Tage anhielt (88). Für Etonitazen existieren solche Daten überhaupt nicht.

Um zu überprüfen wie sich chronische Morphin- und Etonitazenvorbehandlungen auf die Aktivität auswirken, verwendeten wir eine Motilitätstestapparatur. Neben einer erneuten akuten Opioidanwendung interessierte uns, ob nach Langzeitanwendung auch direkte Effekte eines Dopaminagonisten auf die dopaminerge Neurotransmission nachweisbar sind. Daher wurden sowohl die chronischen Morphin- als auch die chronischen Etonitazentiere nach 5 Wochen akut mit Morphin oder Etonitazen (entsprechend ihrer Vorbehandlung) sowie nach 10 Wochen akut mit Apomorphin behandelt und in dem MOTI®-System getestet.

Wir konnten zeigen, dass sich chronisch mit Morphin vorbehandelte Tiere in ihrer Gesamtaktivität während der Habituation (also ohne akuten Substanzeinfluss) nicht von Kontrolltieren unterschieden. Das bedeutet, dass nach einer Abstinenz von 5 Wochen kein Effekt auf die Motilität nachweisbar ist. Nach akuter Morphinapplikation zeigte sich allerdings bei den Kontrolltieren der typische akute depressive Opioideffekt auf die Aktivität, während die mit Morphin vorbehandelten Tiere deutlich weniger von dieser Wirkung betroffen waren. Wir konnten zeigen, dass bei den Kontrolltieren eine hochsignifikant

geringere Aktivität im Test zu beobachten war, während die chronisch mit Morphin vorbehandelten Tiere eine Toleranz gegen den depressiven Opioideffekt hatten.

Eine chronische Morphinvorbehandlung schützte demzufolge nach einer Abstinenzzeit von 5 Wochen immer noch vor den depressiven Morphinwirkungen auf die Motilität, wenn dieses akut erneut appliziert wurde. Die Analyse der Teilaktivitäten in 5-min-Intervallen ergab einen signifikanten Unterschied auch über die gesamte Testdauer von 15 min.

Bei den chronisch mit Etonitazen vorbehandelten Tieren fanden wir, dass sich diese nach einer Abstinenz von 5 Wochen während der Habituation genau wie die chronisch mit Morphin vorbehandelte Gruppe nicht von den Kontrolltieren unterschieden. Es zeigte sich, dass auch chronisches Etonitazen nach einer Abstinenz von 5 Wochen keinen messbaren Einfluss auf die Motilität besaß. Dagegen hatte die akute Etonitazenapplikation im Test sowohl bei den Kontrolltieren als auch den chronisch mit Etonitazen vorbehandelten Tieren einen ausgesprochen starken depressiven Effekt auf die Aktivität, der sich allerdings (im Gegensatz zu den Morphintieren) zwischen diesen beiden unterschiedlich vorbehandelten Gruppen nicht voneinander unterschied. Dies zeigt, dass nach einer Abstinenzzeit von 5 Wochen akut appliziertes Etonitazen auf vorbehandelte Tiere denselben ausgeprägten depressiven Effekt hat wie auf naive Tiere. Es besteht demnach bei den chronisch mit Opioid vorbehandelten Tieren keine Toleranz gegen die Etonitazenwirkung. Dies steht im Einklang mit den entsprechenden Lernversuchen. Die bereits diskutierte geringe Wirkung von Etonitazen auf Toleranzentwicklung und Sensitivierung kann diese Ergebnisse gut erklären.

Neben den Opioidwirkungen wurden akute Apomorphineffekte nach Langzeitabstinenz untersucht, um lang andauernde Verstärkungen des dopaminergen Systems direkt nachweisen zu können. Wir konnten zeigen, dass die Gesamtaktivität der chronisch vorbehandelten Morphingruppe nach akuter Apomorphingabe numerisch höher war als die der Kontrollgruppe. Die Varianzanalyse der Aktivitäten im Test mit Messwertwiederholung ergab einen Trend zu einem Unterschied in den Intervallen in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit. Der Anstieg beider Kurven war allerdings hochsignifikant für beide Gruppen, was den stimulierenden Effekt von

Apomorphin auf die Aktivität verdeutlicht. Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Tiere der chronischen Morphingruppe im Sinne einer Sensitivierung eine höhere Aktivität gezeigt hätten als die Kontrolltiere. Die Analyse der Aktivitäten in 5-min-Intervallen unterstrich diesen Eindruck in den ersten 5 min. Statistisch wurde die Signifikanz jedoch verfehlt ($F_{1,30}=3,529$, $p=0,070$). Es zeigte sich, dass nach 10 Wochen Abstinenz ein Trend zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit des dopaminergen Systems bestand, wohingegen eine opioide Wirkung auf die Lernmodelle nicht mehr bestätigt werden konnte.

Ähnliches zeigte sich bei den mit Etonitazen vorbehandelten Tieren. Auch hier fand sich nach einer Abstinenz von 10 Wochen kein signifikanter Aktivitätsunterschied im Vergleich mit der Kontrollgruppe, wenn Apomorphin im Test akut appliziert wurde. Die Auswertung der Aktivitäten ergab in keinem Intervall einen Unterschied. Im Gegensatz zu den mit Morphin vorbehandelten Tieren, wo ein deutlicher Trend zugunsten des Opioids erkennbar war, unterschieden sich die stimulierenden Wirkungen zwischen den mit Etonitazen vorbehandelten Tieren und der Kontrollgruppe nicht. Beide Kurven zeigten allerdings einen hochsignifikanten Anstieg im Verlauf, der die aktivierende Wirkung von Apomorphin verdeutlicht. Somit war nach einer chronischen Etonitazenbehandlung nach 10 Wochen Abstinenz kein messbarer Einfluss auf das dopaminerge System nachweisbar. Anders als bei Morphin wäre bei Etonitazen ein solcher Effekt von uns auch nicht erwartet worden, da die bereits diskutierte geringere Wirkung auf Toleranzentwicklung und Sensitivierung keine deutliche Verstellung des dopaminergen Systems erwarten ließ.

Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass Etonitazen unabhängig von seiner geringeren Wirkung auf Toleranzentwicklung und Sensitivierung des opioden Systems auch akut eine geringere Dopaminfreisetzung induziert als Morphin (85). Inwiefern dies möglicherweise ein eigener unabhängiger Mechanismus ist, der die fehlende Beeinflussung der Aktivität durch Etonitazen nach Langzeitanwendung erklärt, bleibt vorerst unklar. Es wäre zukünftig sicher sehr interessant, weitere Dosierungen von Apomorphin an chronisch mit Opioiden vorbehandelten Tieren zu testen. Möglicherweise würden Dosierungskurven zu eindeutigeren Resultaten hinsichtlich der stimulierenden Wirkungen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung führen.

5. Zusammenfassung

Das opioide System ist hinsichtlich Lernen und Gedächtnis bereits intensiv erforscht worden. Trotz der vielen Untersuchungen sind einige Ergebnisse zum Teil widersprüchlich, andere ließen wichtige Fragen offen. Wir wollten daher den Stand des gegenwärtigen Wissens über das Opioidsystem hinsichtlich dieser Probleme ergänzen, indem wir die Effekte von opioiden Agonisten und Antagonisten systematisch unter vergleichbaren Bedingungen charakterisierten. Wir machten es uns zur Aufgabe, akute und chronische Einflüsse der beiden Opiode Morphin und Etonitazen sowie des Antagonisten Naloxon auf Lernen und Gedächtnis an zwei etablierten Lernmodellen zu untersuchen. Gleichzeitig interessierte uns, welchen Effekt Opiode auf die Motilität von chronisch vorbehandelten Tieren nach einer Abstinenzperiode haben, und welche Bedeutung Veränderungen der Aktivität dopaminerger Systeme in diesem Zusammenhang zukommt.

Wir konnten zeigen, dass Morphin und Etonitazen nach akuter Behandlung in hohen Dosen an den Lernmodellen Shuttle-Box und Y-Kammer entgegengesetzte Effekte hatten. Morphin verschlechterte die Retention an der Shuttle-Box, ohne eine Veränderung auf das Gedächtnis an der Y-Kammer zu haben. Etonitazen hatte genau den gegenteiligen Effekt. Dies spricht für elementare Unterschiede in den Wirkungen beider Opioidagonisten.

Beiden Substanzen war nach chronischer Applikation gemein, dass sie das Lernen nicht beeinflussten, wohl aber die Retention nach erneuter Gabe. Dabei zeigte sich, dass Morphin im Gegensatz zu den akut behandelten Tieren die Gedächtnisspeicherung in beiden Lernmodellen störte. Dieser Effekt war eindeutig nur 5 Wochen nach Ende der Vorbehandlung evident. Nach 10 Wochen ließ diese Wirkung nach. Veränderungen des dopaminergen Systems in Hinblick auf die Aktivität zeigten nach 10 Wochen einen numerischen Unterschied. Wir postulieren, dass die Unterschiede zwischen den Resultaten der Lernversuche an akuten und chronisch behandelten Tieren in dem hohen Toleranz- und Sensibilisierungspotenzial von Morphin liegen könnte.

Etonitazen hatte bei chronisch vorbehandelten Tieren an den Lernmodellen den gleichen Effekt wie bei den akuten Tieren. Auch auf die Aktivität des dopaminergen Systems hatte es nach dem von uns untersuchten Intervall offenbar keinen Einfluss. In Analogie zu Morphin vermuten wir als Grund für

diese Ergebnisse das bekannte geringe Potenzial von Etonitazen, Toleranz und Sensibilisierung zu induzieren.

Besonders interessant war die Frage nach möglichen Naloxoneffekten, da hierzu die Literatur sehr widersprüchlich ist. Wir konnten an der Shuttle-Box demonstrieren, dass vor dem Training appliziertes Naloxon in keiner der verwendeten Dosierungen einen Effekt auf das Lernen hatte. Darüber hinaus zeigte sich, dass nach dem Training verabreichtes Naloxon weder an der Shuttle-Box noch an der Y-Kammer die Retention beeinflusste. Alle Untersuchungen waren mit einer ausreichenden Tierzahl gepowert. Damit konnten wir den oft postulierten retentionsverbessernden Effekt von Naloxon unter den von uns verwendeten experimentellen Bedingungen nicht reproduzieren.

Zukünftig werden weitere Untersuchungen notwendig sein, die auch mechanistische Fragen beantworten sollten, wie beispielsweise die Rolle der Internalisierungseigenschaften oder die Rezeptorselektivität von Opioiden auf molekularer Ebene die gefundenen Diskrepanzen an den Lernmodellen erklären könnten. Direkte Einflüsse auf das dopaminerge System sollten nach chronischer Anwendung mit verschiedenen Dosierungen von Dopaminagonisten charakterisiert werden. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch, Untersuchungen mit hochpotenten Narkoanalgetika durchzuführen, die größere klinische Relevanz haben als die Experimentalsubstanz Etonitazen.

Literaturverzeichnis

1. Goodman & Gilman's: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th edition, 547-590, Mc Graw Hill, **2005**
2. Pert, C.B., and Snyder, S.H. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science*, **1973**, 179:1011-1014
3. Simon, E.J., Hiller, J.M., and Edelman, I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic ³H-etorphine to rat brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1973**, 70:1947-1949
4. Terenius, L. Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat brain cortex. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, **1973**, 32:317-320
5. Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., Huppler, R.E., and Gilbert, P.E. The effect of morphine- and nalorphine-like drugs in nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog, *J Pharmacol Exp Ther*, **1976**, 197:517-532
6. Akil, H., Mayer, D.J., and Liebeskind, J.C. Comparison in the rat between analgesia induced by stimulation of periaqueductal gray matter and morphine analgesia. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci Ser D*, **1972**, 274:3603-3605
7. Akil, H., Mayer, D.J., and Liebeskind, J.C. Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science*, **1976**, 191:961-962
8. Akil, H., Watson, S.J., Young, E., *et al.* Endogenous opioids: biology and function. *Annu Rev Neurosci*, **1984**, 7:223-255
9. McGaugh, J.L. Memory – a century of consolidation. *Science*, **2000**, 287:248-251
10. Agranoff, B.W., Davis, R.E., Brink, J.J. Chemical studies on memory fixation in the Goldfish. *Brain Res*, **1966**, 1:303-309
11. Kelley, A.E. Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron*, **2004**, 44:161-179
12. Nesse, R.M., and Berridge, K.C. Psychoactive drug use in evolutionary perspective. *Science*, **1997**, 278:63-66
13. Gold, P.E., van Buskirk, R. Facilitation of time-dependent memory processes with posttrial epinephrine injections. *Behav Biol*, **1975**, 13:145-153

14. Lupien, S.J., McEwen, B.S. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Rev*, **1997**, 24:1-27
15. Liang, K.C., Juler, R.G., McGaugh, J.L. Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: involvement of the amygdale noradrenergic system. *Brain Res*, **1986**, 368:125-133
16. McGaugh, J.L., Cahill, L., Roozendaal, B. Involvement of the amygdala in memory storage: interactions with other brain systems. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1996**, 93:13508-13514
17. Woody, C.D., Alkon, D.L., McGaugh, J.L. Cellular mechanisms of conditioning and behavioral plasticity. *New York: Plenum*, **1988**
18. Decker, M.W. The effects of aging on hippocampal and cortical projections of the forebrain cholinergic system. *Brain Res Rev*, **1987**, 12:423-438
19. Stratton, L.O., Petrinovich, L.F. Post-trial injections of an anticholinesterase drug and maze learning in two strains of rats. *Psychopharmacologia*, **1963**, 5:47-54
20. Flood, J.F., Landry, D.W., Jarvik, M.E. Cholinergic receptor interactions and their effects on long-term memory processing. *Brain Res*, **1981**, 215:177-185
21. Aigner, T.G., Mishkin, M. The effects of physostigmine and scopolamine on recognition memory in monkeys. *Behav Neural Biol*, **1986**, 45:81-87
22. Introini-Collison, I.B., McGaugh, J.L. Modulation of memory by post-training epinephrine: involvement of cholinergic mechanisms. *Psychopharmacology*, **1988**, 94:379-385
23. Casamenti, F., Deffenu, G., Abbamondi, A.L., Pepeu, G. Changes in cortical acetylcholine output induced by modulation of the nucleus basalis. *Brain Res Bull*, **1986**, 16:689-695
24. Grecksch, G., Matthies, H. Differential effects of intrahippocampally or systemically applied picrotoxin on memory consolidation in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, **1981**, 14:613-616
25. Martinez, J.L.Jr., Jensen, R.A., Messing, R.B., Rigter, H., McGaugh, J.L. Endogenous peptides and learning and memory processes. *New York: Academic*, **1981**, p. 587
26. Nagel, J.A., Huston, J.P. Enhanced inhibitory avoidance learning produced by post-trial injections of substance P into the basal forebrain. *Behav Neural Biol*, **1988**, 49:374-385

27. Staubli, U., Huston, J.P. Facilitation of learning by post-trial injection of substance P into the medial septal nucleus. *Behav Brain Res*, **1980**, 1:245-255
28. Schlesinger, K., Lipsitz, D.U., Peck, P.L., Pelley, M.A., Stewart, J.M., et al. Substance P enhancement of passive and active avoidance conditioning in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, **1983**, 19:655-661
29. Amir, S., Brown, Z.W., Amit, Z. The role of endorphin in stress: evidence and speculation. *Neurosci Biobehav Rev*, **1980**, 4:77-86
30. Bodnar, R.J., Kelly, D.D., Brutus, M., Glusman, M. Stress-induced analgesia: neural and hormonal determinants. *Neurosci Biobehav Rev*, **1980**, 4:87-100
31. Viveros, O.H., Diliberto, J.R., Hazum, E., Chang, K.J. Enkephalins as possible adrenomedullary hormones: storage secretions and regulation of synthesis. *Adv Biochem Psychopharmacol*, **1980**, 22:191-204
32. Carrasco, M.A., Dias, R.D., Perry, M.L.S., Wofchuk, S.T., Souza, D.O., Izquierdo, I. Effect of morphine, ACTH, epinephrine, Met-, Leu- and des-Tyr-Met-enkephalin on β -endorphin-like immunoreactivity of rat brain. *Psychoneuroendocrinology*, **1982**, 7:229-234
33. McGaugh, J.L. Hormonal influences on memory. *Ann. Rev. Psychol.*, **1983**, 34:297-323
34. McGaugh, J.L., Gold, P.E. Hormonal modulation of memory. *Psychoendocrinology*, **1988**
35. McGaugh, J.L. Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. *Ann Rev Neurosci*, **1989**, 12:255-287
36. Gallagher, M., Naloxone enhancement of memory processes: effects of other opiate antagonists. *Behav Neural Biol*, **1982**, 35:375
37. Messing, R.B., Jensen, R.A., Martinez, J.L.Jr., Spiehler, V.R., Vasquez, B.J., et al. Naloxone enhancement of memory. *Behav Neural Biol*, **1979**, 27:266-275
38. Izquierdo, I. Effect of naloxone and morphine on various forms of memory in the rat: possible role of endogenous opiate mechanisms in memory consolidation. *Psychopharmacology*, **1979**, 66:199-203
39. Izquierdo, I., Souza, D., Dias, R.D., Perry, M.L.S., Carrasco, M., et al. Effect of various behavioral training and testing procedures on brain β -endorphin in behavioural regulation. *Psychoneuroendocrinology*, **1984**, 9:381-389
40. Del Cerro, S., Borrell, J. Naloxone influences retention behaviour depending on the degree of novelty inherent to the training situation. *Physiol Behav*, **1985**, 35:667-671

41. Izquierdo, I., McGaugh, J.L. Effect of a novel experience prior to training or testing on retention of an inhibitory avoidance response in mice: involvement of an opioid system. *Behav Neural Biol*, **1985**, 44:228-238
42. Turnbull B.A., Hill D.L., Miller L.H., McElroy J., Feldman R.S. Effect of high doses of naloxone on shuttle avoidance acquisition in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, **1983**, 19:423-426
43. Werling, L.L., Brown, S.R., Cox, B.M. Opioid receptor regulation of the release of norepinephrine in brain. *Neuropharmacology*, **1987**, 26:987-996
44. Introini-Collison, I.B., Baratti, C.M. Opioid peptidergic systems modulate the activity of β -adrenergic mechanisms during memory consolidation process. *Behav Neural Biol*, **1986**, 46:227-241
45. Liang, K.C., McGaugh, J.L. Lesions of the stria terminalis attenuate the amnesic effect of amygdaloid stimulation on avoidance responses. *Brain Res*, **1983**, 274:309-318
46. Liang, K.C., Messing, R.B., McGaugh, J.L. Naloxone attenuates amnesia caused by amygdaloid stimulation: the involvement of a central opioid system. *Brain Res*, **1983**, 271:41-49
47. Introini-Collison, I.B., Nagahara, A.H., McGaugh, J.L. Memory-enhancement with intra-amygdala posttraining naloxone is blocked by concurrent administration of propranolol. *Brain Res*, **1989**, 476:94-101
48. Izquierdo, I., Graudenz, M. Memory facilitation by naloxone is due to release of dopaminergic and beta-adrenergic systems from tonic inhibition. *Psychopharmacology (Berl)*, **1980**, 67:265-268
49. Tramullas M., Martínez-Cué C., Hurlé M.A. Chronic administration of heroin to mice produces up-regulation of brain apoptosis-related proteins and impairs spatial learning and memory. *Neuropharmacology*, **2008**, 54:640-652
50. Tramullas M., Martínez-Cué C., Hurlé M.A. Chronic methadone treatment and repeated withdrawal impair cognition and increase the expression of apoptosis-related proteins in mouse brain. *Psychopharmacology*, **2007**, 193:107-120
51. Kamboj S.K., Tookman A., Jones L., Curran H.V. The effects of immediate-release morphine on cognitive functioning in patients receiving chronic opioid therapy in palliative care. *Pain*, **2005**, 117:388-395
52. Friswell J., Phillips C., Holding J., Morgan C.J., Brandner B., Curran H.V. Acute effects of opioids on memory functions of healthy men and women. *Psychopharmacology*, **2008**, 198:243-250

53. Dacher M., Nugent F.S. Opiates and plasticity. *Neuropharmacology*, **2011**, Jan 25. [Epub ahead of print]
54. Nestler E.J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci*, **2001**, 2:119-128
55. Hyman S.E., Malenka R.C. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci*, **2001**, 2:695-703
56. Milner B., Squire L.R., Kandel E.R. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, **1998**, 20:445-468
57. Kandel E.R., Pittenger C. The past, the future and the biology of memory storage. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **1999**, 354:2027-2052
58. Nestler E.J. Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol Learn Mem*, **2002**, 8:637-647
59. Mameli M., Lüscher C. Synaptic plasticity and addiction: Learning mechanisms gone awry. *Neuropharmacology*, **2011**, Jan 28. [Epub ahead of print]
60. Lüscher C., Nicoll R.A., Malenka R.C., Muller D. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat Neurosci*, **2000**, 3:545-550
61. Scannevin R.H., Huganir R.L. Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci*, **2000**, 1:133-141
62. Jones S., Kornblum J.L., Kauer J.A. Amphetamine blocks long-term synaptic depression in the ventral tegmental area. *J Neurosci*, **2000**, 20:5575-5580
63. Nicola S.M., Surmeier J., Malenka R.C. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci*, **2000**, 23:185-215
64. Bao G., Kang L., Li H., Li Y., Pu L., Xia P., Ma L., Pei G. Morphine and heroin differentially modulate in vivo hippocampal LTP in opiate-dependent rat. *Neuropsychopharmacology*, **2007**, 32:1738-1749
65. Billa S.K., Liu J., Bjorklund N.L., Sinha N., Fu Y., Shinnick-Gallagher P., Morón J.A. Increased insertion of glutamate receptor 2-lacking alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptors at hippocampal synapses upon repeated morphine administration. *Mol Pharmacol*, **2010**, 77:874-883
66. Hou Y.Y., Lu B., Li M., Liu Y., Chen J., Chi Z.Q., Liu J.G. Involvement of actin rearrangements within the amygdala and the dorsal hippocampus in aversive memories of drug withdrawal in acute morphine-dependent rats. *J Neurosci*, **2009**, 29:12244-12254

67. Van den Oever M.C., Goriounova N.A., Li K.W., Van der Schors R.C., Binnekade R., Schoffelmeer A.N., Mansvelder H.D., Smit A.B., Spijker S., De Vries T.J. Prefrontal cortex AMPA receptor plasticity is crucial for cue-induced relapse to heroin-seeking. *Nat Neurosci*, **2008**, 11:1053-1058
68. Fitzgerald L.W., Ortiz J., Hamedani A.G., Nestler E.J. Drugs of abuse and stress increase the expression of GluR1 and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral tegmental area: common adaptations among cross-sensitizing agents. *J Neurosci*, **1996**, 16:274-282
69. Hyman S.E. Addiction: a disease of learning and memory. *Am J Psychiatry*, **2005**, 162:1414-1422
70. Grecksch G. Verhaltenspharmakologische Charakterisierung von β -Casomorphinpeptiden, *Dissertation B*, **1988**, 47-63
71. Grecksch G., Bartzsch K., Widera A., Becker A., Höllt V., Koch T. Development of tolerance and sensitization to different opioid agonists in rats. *Psychopharmacology*, **2006**, 186:177-184
72. Emmerson P.J., Liu M.R., Woods J.H., Medzihradsky F. Binding affinity and selectivity of opioids at mu, delta and kappa receptors in monkey brain membranes. *J Pharmacol Exp Ther*, **1994**, 271:1630-1637
73. Dykstra L.A., Wharton W., McMillan D.E. Antagonism of etonitazene's effects in rats and pigeons. *Pharmacol Biochem Behav*, **1977**, 6:215-219
74. Shannon H.E., Holtzman S.G. Further evaluation of the discriminative effects of morphine in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, **1977**, 201:55-66
75. Braidia D., Gori E., Sala M. Relationship between morphine and etonitazene-induced working memory impairment and analgesia. *Eur J Pharmacol*, **1994**, 271:497-504
76. White N., Major R., Siegel J. Effects of morphine on one-trial appetitive learning. *Life Sci*, **1978**, 19:1967-1971
77. Belluzzi J.D., Stein L. Brain endorphin – possible role in long term memory. *Ann NY Acad Sci*, **1982**, 398:221
78. Classen W., Mondadori C. Facilitation or inhibition of memory by morphine: a question of experimental parameters. *Experientia* 40, **1984**, 506
79. Moolten M.S., Fishman J.B., Chen J.C., Carlson K.R. Etonitazene: an opioid selective for the mu receptor types. *Life Sci*, **1993**, 52:199-203
80. Koch, T., Widera, A., Bartzsch, K. *et al.* Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Mol Pharmacol*, **2005**, 67:280-287

81. Izquierdo I., Souza D.O., Carrasco M.A. Dias R.D., Perry M.L. Eisinger S., Elisabetsky E., Vendite D. Beta-endorphin causes retrograde amnesia and is released from the rat brain by various forms of training and stimulation. *Psychopharmacology*, **1980**, 70:173-177
82. Izquierdo I., Dias R.D., Souza D.O., Carrasco M.A., Elisabetsky E., Perry M.L. The role of opioid peptides in memory and learning. *Behav Brain Res*, **1980**, 1:451-468
83. Izquierdo I. Effect of beta-endorphin and naloxone on acquisition, memory and retrieval of shuttle avoidance and habituation learning in rats. *Psychopharmacology*, **1980**, 69:111-115
84. Izquierdo I., Paiva A.C.M., Elisabetsky E. Post-training intraperitoneal administration of leu-enkephalin and beta-endorphin causes retrograde amnesia for two different tasks in rats. *Behav Neural Biol*, **1980**, 28:246-250
85. Piepponen T.P., Honkanen A., Kivastik T., Zharkovsky A., Turtia A., Mikkola J.A., Ahtee L. Involvement of opioid mu1-receptors in opioid-induced acceleration of striatal and limbic dopaminergic transmission. *Pharmacol Biochem Behav*, **1999**, 63:245-252
86. Jensen R.A., Martinez Jr J.L., Messing R.B., Spiehler V., Vasquez B.J., Soumireu-Mourat B., Liang K.C., McGaugh J.L. Morphine and naloxone alter memory in the rat. *Neurosci Abstr*, **1978**, 4:260
87. Castellano C. Dose-dependent modulation of memory by the enkephalin analog FK33-824 in C57BL/6 mice. *Behav Neural Biol*, **1982**, 36:189-196
88. Kalivas P.W., Duffy P. Sensitization to repeated morphine injection in the rat: possible involvement of A10 dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, **1987**, 241:204-212
89. Ingram S.L., Vaughan C.W., Bagley E.E., Connor M., Christie M.J. Enhanced opioid efficacy in opioid dependence is caused by an altered signal transduction pathway. *J Neurosci*, **1998**, 18:10269-10276
90. Ojanen S., Koistinen M., Bäckström P., Kankaanpää A., Tuomainen P., Hyytiä P., Kiianmaa K. Differential behavioural sensitization to intermittent morphine treatment in alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats: role of mesolimbic dopamine. *Eur J Neurosci*, **2003**, 17:1655-1663

Danksagung

Für die Anfertigung dieser Dissertation gilt mein ganz besonderer Dank Frau Prof. Dr. med. Gisela Grecksch für die Vergabe dieses interessanten Themas sowie für ihre stets fachlich-konstruktive und motivierende Unterstützung. Ihre unermüdliche Geduld sowie ihr stets offenes Ohr für Probleme waren ein wichtiger Motor zur Realisierung der vorliegenden Arbeit.

Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Volker Höllt für die Bereitstellung aller für die Arbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie notwendigen Ressourcen.

Weiterhin möchte ich Gabriele Schulze, Petra Dehmel, Beate Reuter, Doreen Heidemann sowie Kathrin Freke danken, deren wertvolle Tipps zum artgerechten Umgang mit den Versuchstieren, zur korrekten Substanzapplikation und zur Einführung in die Lernmodelle eine wesentliche Grundlage dieser Arbeit darstellte.

Meinen Eltern Klaus und Elisabet möchte ich herzlich danken, dass sie den von mir beschrittenen Bildungsweg ermöglicht und unterstützt haben.

Ganz besonderer Dank gilt auch meiner Ehefrau Julia, die mit viel Geduld das Entstehen dieser Arbeit begleitet und mich stets zum Weitermachen ermuntert hat.

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Akute und chronische Effekte opioider Agonisten und Antagonisten auf Lernen und Gedächtnis“

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 25.04.2011

Unterschrift

Darstellung des Bildungsweges

Name: Drust
Vorname: Andreas
Geburtsdatum: 07.06.1978
Geburtsort: Osterburg
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

- September 1985 – Juli 1997: Grundschule, Sekundarschule, Gymnasium
- Juli 1997: Abitur & Auszeichnung mit „Dr.-Wilhelm-Palmquist-Preis“

1. Studium:

- April 1998 – Juni 2003: Studium der Pharmazie an der Technischen
Universität Carolo Wilhelmina Braunschweig
- Juni 2003: Approbation als Apotheker

2. Studium:

- Oktober 2003 – November 2009: Studium der Humanmedizin an der
medizinischen Fakultät der Otto-von-
Guericke Universität Magdeburg
- November 2009: Approbation als Arzt

Berufsausübung:

- Juni 2003 – Dezember 2006: angestellter Apotheker in der Adler-
Apotheke Stendal
- Januar 2007 – Dezember 2009: angestellter Apotheker in der Apotheke-
Groß-Ottersleben Magdeburg
- seit Januar 2010: Assistenzarzt im Institut für Klinische Pharmakologie
des Universitätsklinikums Magdeburg

Magdeburg, 25.04.2011